

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA**



**TESIS**

**CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES DE NEMATODOS  
DEL GÉNERO *Meloidogyne* ASOCIADAS AL CULTIVO DE UVA  
DE MESA (*Vitis vinifera* L.) EN LAS PRINCIPALES ZONAS  
PRODUCTORAS DEL NORTE DEL PERÚ**

**PRESENTADA POR:**

**Br. JOSÉ MANUEL ALBÁN PONGO**

**PARA OPTAR EL TÍTULO DE  
INGENIERO AGRÓNOMO**

**PIURA, PERÚ**

**2018**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**


**ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA**

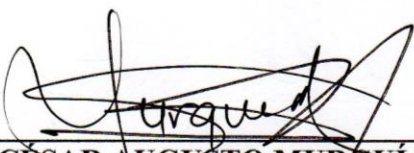


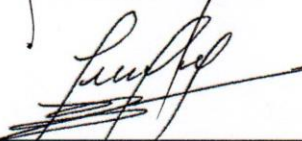
**TESIS**

**CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES DE NEMATODOS DEL  
GÉNERO *Meloidogyne* ASOCIADAS AL CULTIVO DE UVA DE  
MESA (*Vitis vinifera* L.) EN LAS PRINCIPALES ZONAS  
PRODUCTORAS DEL NORTE DEL PERÚ**

**PRESENTADA POR:**

  
**Br. JOSÉ MANUEL ALBÁN PONGO**  
**TESISTA**

  
**Dr. CÉSAR AUGUSTO MURGUÍA REYES**  
**ASESOR**

  
**Ing. ISRAEL LIMA MEDINA Ph.D.**  
**CO - ASESOR**

**PIURA, PERÚ**

**2018**

## DECLARACION JURADA DE AUTENTICIDAD DE LA TESIS

Yo: **Br. JOSÉ MANUEL ALBÁN PONGO**, identificado con DNI N° 48515980 Bachiller de la Escuela Profesional de Agronomía, de la Facultad de Agronomía y domiciliado en A.H. López Albuja, Mz. K, Lote 10, Distrito 26 de Octubre, Provincia de Piura, Departamento de Piura, con Email: manuel.alpo@outlook.com

**DECLARO BAJO JURAMENTO:** que la tesis que presento es auténtica e inédita, no siendo copia parcial ni total de una tesis desarrollada y/o realizada en el Perú o en el extranjero, en caso contrario de resultar falsa la información que proporciono, me sujeto a los alcances de lo establecido en el Art. N° 411, del código penal concordante con el Art.32 de la ley N° 27444, y ley del Procedimiento Administrativo General y las Normas Legales de Protección a los Derechos de Autor.

En fé de lo cual firmo la presente.

Piura, Junio del 2018

  
DNI N°48515980

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA**



**TESIS**

**CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES DE NEMATODOS DEL  
GÉNERO *Meloidogyne* ASOCIADAS AL CULTIVO DE UVA DE  
MESA (*Vitis vinifera* L.) EN LAS PRINCIPALES ZONAS  
PRODUCTORAS DEL NORTE DEL PERÚ**

**APROBADA POR:**

**Dr. EDGAR R. RODRÍGUEZ GÁLVEZ**  
**PRESIDENTE**

**Ing. EDGAR A. MALDONADO DUQUE**  
**VOCAL**

**Ing. ANGELINO CORDOVA PEÑA MSc.**  
**SECRETARIO**

**PIURA, PERÚ**

**2018**





UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
COMISION DE INVESTIGACION AGRICOLA



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS  
061-2017-CIAFA-UNP

Los miembros del jurado calificador que suscriben, congregados para estudiar el Trabajo de Tesis denominado **"CARACTERIZACION DE POBLACIONES DE NEMATODOS DEL GÉNERO *Meloidogyne* ASOCIADAS AL CULTIVO DE UVA DE MESA (*Vitis vinifera* L.) EN LAS PRINCIPALES ZONAS PRODUCTORAS DEL NORTE DEL PERU"**, conducido por el **BR. JOSE MANUEL ALBAN PONGO**, asesorada por el **Dr. Cesar Murguía Reyes y Co** – asesorada por el **Ing. Israel Lima Medina PH.D.**

Luego de oídas las observaciones y respuestas a las preguntas formuladas, lo declaran **APROBADO**, en consecuencia queda en condiciones de ser calificado **APTO** para gestionar ante el Consejo Universitario de la Universidad Nacional de Piura, el Título Profesional de Ingeniero Agrónomo de conformidad con lo estipulado en el artículo N° 171, inciso 2° del Estatuto General de la Universidad Nacional de Piura.

Piura, 11 de Diciembre del 2017.

Dr. Edgar R. Rodríguez Gálvez  
Presidente

Ing. Edgar A. Maldonado Duque  
Vocal

Ing. Angelino Córdova Peña MSc.  
Secretario

## **DEDICATORIA:**

*A Dios por bendecirme.*

*A mis padres que me han apoyado de forma incondicional en cada paso que doy sobretodo en el tiempo que significó la Tesis.*

*A mis hermanos, que de alguna forma intento ser su ejemplo y que puedan salir adelante.*

*A mis profesores que han sido una guía en mi vida profesional, a los que estaré eternamente agradecido.*

*Al Departamento Académico de Sanidad Vegetal, donde encontré un lugar de aprendizaje y crecimiento personal.*

*A mis compañeros de Tesis, que juntos pudimos afrontar las dificultades que se nos presentaron.*

*A las personas que forman parte de mi vida a las que agradezco su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos felices y difíciles de mi vida.*

## **AGRADECIMIENTO:**

El presente trabajo fue financiado por Innovate Perú (Ministerio de la Producción) mediante el Proyecto titulado: “Diversidad biológica de poblaciones peruanas de *Meloidogyne* spp.: Descripción y caracterización de especies a través del uso de isoenzimas y marcadores moleculares” correspondiente al Convenio N° 346-PNICP-BRI-2015.

Al Dr. César A. Murguía Reyes por haber confiado en mi persona desde un inicio, por la paciencia, las enseñanzas y la dirección de este trabajo.

Al Ph.D. Israel Lima Medina por haber sido parte de la dirección de este trabajo y ser el apoyo en la realización de la Tesis.

Al Ing. Edgar Abraham Maldonado Duque por haber sido un guía en lo profesional y haberme inculcado la Nematología.

## RESUMEN

Los “nematodos de las agallas radiculares” *Meloidogyne* spp. causan daños en la producción de uva de mesa en el Perú, especialmente en condiciones áridas y cálidas como en la costa norte del país. Los altos niveles de infestación causan la pérdida de vigor de las plantas en poco tiempo y en algunos casos es necesario la replantación del cultivo. Considerándose la importancia económica que representan para el país las exportaciones de uva de mesa es necesario realizar estudios más profundos para determinar la ocurrencia, distribución e identificación de especies de *Meloidogyne*. En el presente estudio se realizaron muestreos nematológicos en diferentes regiones productoras de este cultivo para obtener poblaciones e identificar las especies de *Meloidogyne* a través del análisis de isoenzimas, la caracterización morfológica del diseño perineal de hembras y cuantificar la densidad poblacional del nematodo. Se obtuvieron 14 poblaciones del nematodo procedentes de raíces y suelo de plantas de vid en diferentes zonas productoras de las regiones de Piura, Lambayeque y La Libertad. Se identificaron cinco especies de *Meloidogyne* asociadas al cultivo de uva de mesa en la costa norte del Perú, correspondientes a las especies: *M. morocciensis* Est. A3, *M. arenaria* Est. A2, *M. incognita* Est. I2, *M. ethiopica* Est. E3 y *M. javanica* Est. J2. Considerándose el porcentaje de ocurrencia del nematodo en las muestras analizadas se determina que en la región Piura el *M. morocciensis* es la especie predominante en el cultivo de uva, seguida de *M. arenaria* y *M. incognita*. *M. ethiopica* sólo se detectó en el sector Huápalas ubicado en el valle del Alto Piura. En la región La Libertad no se observa predominancia de ninguna especie. *M. arenaria* predomina en dos de las tres muestras analizadas procedentes de la región Lambayeque. Se demuestra que las tres regiones ubicadas en la costa norte del Perú, la nematofauna asociada a la rizosfera de plantas de uva es diversa en especies de *Meloidogyne*.

**Palabras clave:** Nematodo del nudo, uva de mesa, isoenzimas, *M. morocciensis*.



## ABSTRACT

The "root-knot nematode" *Meloidogyne* spp. they cause damages in the production of table grapes in Peru, especially in arid and warm conditions such as on the north coast of the country. High levels of infestation cause the loss of vigor of the plants in a short time and in some cases it is necessary to replant the crop. Considering the economic importance that exports of table grapes represent for the country, it is necessary to carry out more in-depth studies to determine the occurrence, distribution and identification of *Meloidogyne* species. In the present study, nematological samples were taken in different regions producing this crop to obtain populations and identify the *Meloidogyne* species through the analysis of isoenzymes, the morphological characterization of the perineal design of females and quantify the population density of the nematode. Fourteen nematode populations were obtained from the roots and soil of table grape plants in different producing areas of the Piura, Lambayeque and La Libertad regions. Five species of *Meloidogyne* associated to the cultivation of table grape in the north coast of Peru were identified, corresponding to the species: *M. morocciensis* Est. A3, *M. arenaria* Est. A2, *M. incognita* Est. I2, *M. ethiopica* Est. E3 and *M. javanica* Est. J2. Considering the percentage of occurrence of the nematode in the analyzed samples, it is determined that in the Piura region, *M. morocciensis* is the predominant species in grape cultivation, followed by *M. arenaria* and *M. incognita*. *M. ethiopica* was only detected in the Huápalas sector located in the Alto Piura valley. In the La Libertad region there is no predominance of any species. *M. arenaria* predominates in two of the three samples analyzed from the Lambayeque region. It is shown that the three regions located on the north coast of Peru, the nematofauna associated with the rhizosphere of grape plants is diverse in *Meloidogyne* species.

**Key words:** Root-knot nematode, table grape, isoenzymes, *M. morocciensis*.

# ÍNDICE GENERAL

	Pág.
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1. Objetivo general	2
1.2. Objetivos específicos	2
 <b>CAPÍTULO 2: REVISIÓN DE BIBLIOGRAFIA</b>	
2.1. Origen y morfología de la vid	3
2.2. Efecto de los patrones sobre la variedad	4
2.3. Nematodos asociados a la uva de mesa	4
2.3.1. <i>Meloidogyne</i> spp.	5
2.3.2. Distribución y hospedantes	5
2.3.3. Ciclo de vida	5
2.3.4. Formas de reproducción.	9
2.3.5. Factores del ambiente que afectan el desarrollo del nematodo	10
2.3.6. Sintomatología	11
2.3.7. Resistencia de patrones de vid a nematodos	11
2.4. Identificación de especies de <i>Meloidogyne</i>	12
2.4.1. Uso de patrones perineales	13
2.4.2. Análisis electroforéticos de proteínas e isoenzimas	13
 <b>CAPITULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS</b>	15
3.1. Lugar y periodo de ejecución	15
3.1.1. Ubicación geográfica de las zonas muestreadas para la Obtención de poblaciones de <i>Meloidogyne</i> spp.	15
3.1.2. Fase de Laboratorio	15
3.2. Muestreos	16
3.3. Procesamiento y extracción de nematodos de muestras de suelo	16
3.4. Procesamiento y extracción de huevos más J2 de <i>Meloidogyne</i> spp. de raíces	17

3.5.	Aislamiento de poblaciones	18
3.5.1.	Obtención de poblaciones en plantas de tomate	18
3.5.2.	Purificación de poblaciones de <i>Meloidogyne</i> spp.	18
3.6.	Observación de diseños perineales hembras de <i>Meloidogyne</i> spp.	18
3.7.	Caracterización bioquímica para especies de <i>Meloidogyne</i>	20
<b>CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSION</b>		22
4.1.	Obtención de poblaciones de <i>Meloidogyne</i> spp	22
4.2.	Caracterización bioquímica	26
4.3.	Caracterización morfológica	31
<b>CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES</b>		33
<b>CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES</b>		34
<b>CAPÍTULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>		35

## ÍNDICE DE CUADROS

		Página
<b>Cuadro 1</b>	Ubicación geográfica de las principales zonas productoras de uva de mesa en el norte del Perú.	15
<b>Cuadro 2</b>	Niveles de infestación en suelo e inóculo en 14 poblaciones de <i>Meloidogyne</i> spp. procedentes del cultivo de uva en diferentes zonas productoras de la costa norte del Perú.	22
<b>Cuadro 3</b>	Fenotipos isoenzimáticos de esterasa y los porcentajes de ocurrencia por muestra observados en 14 poblaciones de <i>Meloidogyne</i> spp. provenientes de plantas de uva de mesa colectados en las regiones de La Libertad, Piura y Lambayeque en la costa norte del Perú.	29

## ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
<b>Figura 1</b>	Procedimiento para la extracción de nematodos en el suelo.	17
<b>Figura 2</b>	Técnica para la obtención de diseños perineales de <i>Meloidogyne</i> .	19
<b>Figura 3</b>	Procedimiento para la caracterización morfológica de hembras de <i>Meloidogyne</i> spp.	19
<b>Figura 4</b>	Protocolo para la obtención de los perfiles esterásicos de especies de <i>Meloidogyne</i> .	21
<b>Figura 5</b>	Localización y distribución de especies de <i>Meloidogyne</i> en el cultivo de uva de mesa en el distrito de Chepén, de la región La Libertad.	23
<b>Figura 6</b>	Localización y distribución de especies de <i>Meloidogyne</i> en el cultivo de uva de mesa en el distrito de Lambayeque en la región Lambayeque.	24
<b>Figura 7</b>	Localización y distribución de especies de <i>Meloidogyne</i> en el cultivo de uva de mesa en los distritos de Piura, Sullana y Morropón en la región Piura.	25
<b>Figura 8</b>	Plantas de vid severamente afectadas por <i>Meloidogyne</i> spp. en un campo comercial ubicado en el valle de Cieneguillo Centro, Piura.	26

<b>Figura 9</b>	Plantas de vid severamente afectadas por <i>Meloidogyne</i> spp. en un campo comercial ubicado en la región La Libertad.	26
<b>Figura 10</b>	Geles conteniendo perfiles esterásicos detectados en 14 poblaciones de <i>Meloidogyne</i> spp. provenientes del cultivo de uva de mesa en las diferentes regiones geográficas de la costa norte del Perú.	30
<b>Figura 11</b>	Movilidad relativa (Rm) y fenotipos de esterasa (Est) detectados en 14 poblaciones de <i>Meloidogyne</i> spp. aisladas del cultivo de uva en diferentes regiones geográficas de la costa norte del Perú.	30
<b>Figura 12</b>	Patrones perineales de cinco especies de <i>Meloidogyne</i> .	32



# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUCCIÓN

La uva de mesa (*Vitis vinifera* L.) se cultiva en Ica y otras regiones del norte del Perú, se exporta a más de 60 mercados, siendo Estados Unidos el principal mercado de exportación (38 % de participación), seguido de los Países Bajos, Hong Kong y China. En el 2016, el Perú se consolidó como el segundo exportador de uvas a Estados Unidos y el quinto a nivel mundial, superando los US\$ 650 millones en ventas con un volumen total de 288,178 toneladas (ADEX, 2016). La uva de mesa es actualmente la fruta fresca peruana de mayor exportación, por encima del espárrago y con perspectivas de crecimientos favorables en el mercado mundial.

*V. vinifera* L. es nativa del Asia y de la región del Cáucaso, desde ahí se diseminó a toda Europa, la cuenca del Mediterráneo, la región subtropical de Australia, África del Sur y Norte y Sur América (Brown *et al.*, 1993). La adaptación satisfactoria de la uva de mesa al clima cálido y seco de Piura y Lambayeque la ha convertido en un cultivo prioritario para la diversificación de la agricultura en estas regiones. Sin embargo, las plagas y enfermedades que amenazan a este cultivo adquieren mayor importancia como factores adversos. Los nematodos parásitos que afectan las raíces de la vid, principalmente, el “nematodo de las agallas radiculares” (*Meloidogyne* spp.) es el más diseminado y severo en suelos arenosos, causando niveles de daños que inciden en la disminución de los rendimientos en pocos años.

La viticultura en el norte del Perú se inició aproximadamente durante el año 2007, las plantaciones comerciales iniciaron sus actividades con la introducción del cultivar Red Globe injertada sobre los patrones MGT, Harmony y Freedom. Los altos niveles de infestación de *Meloidogyne* spp. observados sobre estos patrones y la disminución del vigor del cultivo demuestran que presentan alta susceptibilidad a este nematodo, causando pérdidas en la producción en poco tiempo y en algunos casos es necesario la replantación del cultivo. Considerándose la importancia económica que representan para el país las exportaciones de uva de mesa y debido también al daño que ocasionan *Meloidogyne* spp. es necesario realizar estudios más profundos para determinar la ocurrencia, distribución e identificación de especies de “nematodos de las agallas radiculares” en uva de mesa en el

norte del Perú. En el presente estudio, se identificaron las especies de *Meloidogyne* asociadas a uva de mesa en algunas zonas productoras del norte del Perú a través de la técnica de electroforesis (estudios de isoenzimas) con la finalidad de realizar una caracterización más precisa y contribuir al mayor conocimiento de este importante parásito del cultivo de uva.

### **1.1. Objetivo general**

**a.** Caracterización de poblaciones de *Meloidogyne* asociadas al cultivo de uva de mesa en las principales zonas productoras de los departamentos de Piura, Lambayeque y La Libertad ubicados en el norte del Perú.

### **1.2. Objetivos específicos**

**a.** Cuantificación de la densidad poblacional de *Meloidogyne* spp. asociadas al cultivo de uva de mesa en algunas zonas productoras de las regiones de Piura, Lambayeque y La Libertad.

**b.** Identificación de especies de *Meloidogyne* procedentes de poblaciones aisladas del cultivo de uva de mesa a través del análisis de isoenzimas.

**c.** Caracterización morfológica del diseño perineal de hembras de *Meloidogyne* spp. de poblaciones aisladas del cultivo de uva de mesa.

## CAPÍTULO 2

### 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1. Origen y morfología de la vid

*V. vinifera* L. es nativa del Asia y de la región del Cáucaso, desde ahí se diseminó a toda Europa, la cuenca del Mediterráneo, la región subtropical de Australia, África del Sur y Norte y Sur América (Brown *et al.*, 1993).

La planta de la vid es una enredadera que se debe podar severamente para regular el crecimiento y entutorarla si se quiere elevar por encima del suelo, es por esto que se distingue fácilmente de otras especies frutales. El tronco se divide en brazos, y ambas estructuras están constituidas por madera vieja. Los brazos son los portadores de la madera de poda; pitones y/o cargadores, sobre los cuales se desarrollan los brotes del año. Los brotes se originan de las yemas, están constituidos por entrenudos separados por abultamientos, también llamados nudos, donde se insertan: hojas, inflorescencias, zarcillos y yemas. La longitud del sarmiento va de uno a varios metros, dependiendo del cultivar, vigor y sanidad. El brote de la vid tiene una característica propia, la dorsiventralidad, según ésta, todas las yemas prontas se ubican en el dorso, y las latentes en el vientre. Presenta varias raíces principales, que nacen lateralmente sobre la porción del tallo usado como estaquilla, estas dan nacimiento a las secundarias, para finalizar en las absorbentes, conformando todo el conjunto la cabellera. Las raíces colonizan las capas poco profundas del suelo, comprendidas entre los 20 y 50 cm, aunque excepcionalmente se pueden encontrar hasta los 6 m (Reynier, 1995).

La disposición de las hojas en el brote es alterna y opuesta. Éstas se componen de un pecíolo y un ensanchamiento en lámina, llamado limbo. La hoja se compone de cinco lóbulos, separados por senos o interrupciones marcadas en la dentadura de la hoja. La hoja adulta es el órgano principal para el reconocimiento de cultivares y patrones, ya que varían en tamaño, vello, forma y color. La importancia de las hojas se desprende de sus funciones, que son: transpiración, fotosíntesis y respiración (Reynier, 1995; Hidalgo, 1999).

Después de la floración, la inflorescencia queda suspendida del pedúnculo recibiendo el nombre de racimo, el cual está compuesto por el raquis y los frutos, también llamados bayas. En la baya, el tamaño, forma, color, consistencia, sabor, y separación del pedicelo, así como el número y tamaño de las semillas también son características varietales (Reynier, 1995; Colapietra y Sicuro, 2001).

## **2.2. Efectos de los patrones sobre la variedad**

El uso de patrones empieza alrededor del año 1880, como un método eficaz para la lucha contra el piojo de las raíces *Phylloxera vitifoliae* (Fitch). Gran parte de la viticultura mundial se basa principalmente en el injerto, en el que el vástago es un cultivar de *Vitis vinifera* L. y el patrón es una especie de *Vitis* o un híbrido interespecífico de *Vitis* (Weaver, 1976). La razón principal para usar patrones es por su resistencia a algunos graves problemas bióticos como la filoxera y a los nematodos. Reynolds y Wardle (2001) esbozaron siete criterios principales para la elección del patrón: la resistencia a la filoxera, resistencia a los nematodos, la adaptabilidad a los suelos de alto pH, adaptabilidad a suelos salinos, la adaptabilidad a los suelos de bajo pH, la capacidad de adaptación a la humedad o suelos mal drenados y la capacidad de adaptación a la sequía. Numerosos estudios han demostrado que los patrones afectan el crecimiento, rendimiento y calidad de la fruta de la vid y la calidad del vino. Estos efectos son consecuencias de una manera más o menos indirecta de las interacciones entre los factores ambientales y de la fisiología de la variedad y patrones empleados.

## **2.3. Nemátodos asociados a la uva de mesa**

Todas las especies de nematodos asociadas a la vid son edáficas y se alimentan de sus raíces, el efecto que producen es, en muchos casos, de muy difícil evaluación debido, por un lado, a su asociación con otros organismos patógenos y, por otro al hecho de que los síntomas que producen son en general inespecíficos, como falta de vigor, bajo rendimiento, decoloraciones y poca resistencia a la sequía, que pueden confundirse con estrés hídrico o deficiencias nutricionales. La aparición de esta sintomatología en manchas dentro del cultivo permite sospechar que está causada por nematodos. La nematofauna asociada al cultivo de vid está representada por unas 300 especies, pertenecientes a 72 géneros, con especies fitoparásitas, saprófagas o depredadoras. Entre ellas, se han citado 37 especies parásitas de la vid, siendo los nematodos de mayor repercusión en el viñedo los ectoparásitos migratorios vectores de virus de la familia Longidoridae, aunque los más

importantes por su acción directa sobre el cultivo son los endoparásitos sedentarios del género *Meloidogyne*, endoparásitos migratorios del género *Pratylenchus*, semiendoparásitos como *Tylenchulus semipenetrans* que origina problemas graves principalmente en los viñedos de Australia, ectoparásitos sedentarios como *Macroposthonia xenoplax* que produce clorosis y otras alteraciones en viñedos de California y algunas especies de *Paratylenchus*, los ectoparásitos migratorios de los géneros *Helicotylenchus*, *Rotylenchus* y *Tylenchorhynchus* aparecen frecuentemente asociados al cultivo, pero se conoce poco de su posible patogenicidad (Arias y Navacerrada, 1973; Ferris y McKenry, 1975; Pinochet y Cisneros, 1986; Loubser, 1988; Brown *et al.*, 1993; Pinkerton *et al.*, 2004).

### **2.3.1. *Meloidogyne* spp.**

El género *Meloidogyne* Goeldi, 1892 (Nematoda: Heteroderidae) comprende a un grupo de nematodos parásitos de plantas de amplia distribución en el mundo, son polífagos y endoparásitos de raíces, se conocen como los “nematodos formadores de nódulos o agallas radicales”. Se han descrito más de 100 especies validas, pero se considera que cuatro son las especies importantes y destructivas que causan el 90 % del daño estimado en el mundo (Sasser, 1980; Eisenback *et al.*, 1981; Siddiqi, 2000).

### **2.3.2. Distribución y hospedantes**

Las especies de *Meloidogyne* son parásitos obligados con una amplia distribución geográfica y rango de hospedantes. Tienen la capacidad de infectar raíces de numerosas plantas, con un rango de hospedantes que comprende más de 3.000 especies vegetales (Abad *et al.*, 2003), por lo tanto, se pueden considerar en general como polífagos. *M. incógnita*, *M. arenaria*, *M. javanica* y *M. hapla* son las especies generalizadas que representan el 95 % de los nematodos formadores de agallas radicales. Las primeras tres especies son de regiones tropicales y templadas, mientras que *M. hapla* se encuentra en climas fríos (Lamberti, 1979).

### **2.3.3. Ciclo de vida**

*Meloidogyne* spp. son endoparásitos de raíces secundarias y tubérculos, sobre los cuales producen deformaciones y agallas en plantas infectadas. Se reproducen principalmente por partenogénesis, aunque se puede presentar la fertilización sexual y la

diferenciación de sexos puede estar determinada por el medioambiente (Williamson y Hussey, 1996).

Los huevos de *Meloidogyne* spp., se encuentran inmersos en una masa gelatinosa, la cual los mantiene juntos y los protege tanto de las condiciones ambientales extremas como de depredadores. La masa gelatinosa está compuesta por glicoproteínas, se le atribuye propiedades antimicrobianas. Generalmente, están depositadas en la superficie de los nódulos, pero algunas veces se encuentran directamente sobre la superficie o dentro del tejido de la raíz de la planta hospedante. La masa de huevos es inicialmente suave, pegajosa y hialina, pero se hace más firme y de color marrón oscuro con el tiempo (Moens *et al.*, 2009). Se pueden encontrar más de 1000 huevos en una masa, su tamaño puede ser más grande que el cuerpo de la hembra (Taylor y Sasser, 1983).

El desarrollo del huevo comienza breves horas después de la ovoposición, resultando en 2, 4, 8, 16 a más células, hasta que se ve el primer estado juvenil completamente formado, enrollado y con un estilete. Se puede mover dentro del huevo, pero no es muy activo. La primera muda tiene lugar en el huevo y no es difícil distinguir la cutícula del primer estado juvenil, sobresaliendo más allá de la cabeza del segundo estado juvenil (J2). Poco después, este emerge rompiendo la membrana flexible del huevo, por medio de pinchazos repetidos con el estilete. La eclosión de los huevos es influenciada por la temperatura y ocurre sin requerir ningún estímulo por parte de la raíz de la planta, sin embargo, los exudados radiculares algunas veces estimulan la eclosión (Taylor y Sasser, 1983; Karssen y Moens, 2006).

El juvenil de segundo estado que ha emergido, se mueve a través del suelo en busca de una raíz de la que pueda alimentarse. Su capacidad de sobrevivir se ve reforzada por varias adaptaciones fisiológicas y bioquímicas, incluyendo la quiescencia y la diapausa, y las reservas de lípidos que prolongan su viabilidad hasta que llega e invade la planta hospedante (Moens *et al.*, 2009). La búsqueda de la raíz es al azar hasta que se acerca a unos cuantos centímetros. Luego, son atraídos por los exudados radiculares, acumulándose y penetrando la raíz por la zona de elongación debajo del punto de crecimiento. Se considera que el dióxido de carbono es el factor más importante para atraer a los juveniles de segundo estado (Taylor y Sasser, 1983; Hussey y Janssen, 2001; Karssen y Moens, 2006).



El juvenil de segundo estado penetra la raíz a través de algún punto de la zona subapical donde la endodermis presenta escaso desarrollo y no constituye una barrera física para el ingreso hacia el interior (Wyss *et al.*, 1992). El nematodo avanza hasta el tejido cortical y una vez allí la migración continúa intercelularmente hasta llegar al cilindro vascular en diferenciación. El avance a través del espacio intercelular se realiza recurriendo a la separación de la laminilla media por medios mecánicos a través de golpes de estilete, sin haberse precisado hasta la fecha si también concurren mecanismos enzimáticos en el proceso. Cada juvenil establece su sitio permanente de alimentación una vez que alcanza el cilindro vascular (Hussey y Williamson, 1998). Este sitio consiste en un conjunto de grandes células modificadas llamadas células gigantes, caracterizadas por la presencia de muchos núcleos de gran tamaño, altamente lobulados, con nucléolos prominentes, un alto número de orgánulos, citoplasma denso con altas tasas metabólicas y paredes engrosadas e invaginadas. Los nematodos absorben los nutrientes del citoplasma directamente o a través de tubos de alimentación sintetizados con tal propósito mediante las secreciones procedentes de las glándulas subesofágicas dorsales (Hussey y Mims, 1991).

Varios estudios han documentado los efectos de la infección por nematodos en la expresión génica. Algunos estudios en las células gigantes han revelado que el ARNm de algunos genes puede estar presente en niveles muchas veces mayor que en células de una raíz no infectada (Ramsey *et al.*, 2004; He *et al.*, 2005). También se ha reportado que se incrementa los niveles de enzimas oxidoreductasas, indicando un aumento en la actividad metabólica (Hussey y Janssen, 2001; Karssen y Moens, 2006).

Los nematodos de las agallas radiculares secretan a través de su cutícula, enzimas antioxidantes que son producidas en la hipodermis y protegen al nematodo de la respuesta oxidativa del hospedante frente a la infección. Así también, las proteínas producidas y secretadas por las células de las glándulas esofágicas dentro de la planta hospedante por medio del estilete, son señales moleculares que desencadenan la activación de rutas de señalización, que conducen a la supresión de la defensa del hospedante y a la inducción de células gigantes (Abad *et al.*, 2009).

Mientras se están formando las células gigantes y los nódulos, aumenta el ancho del nematodo y hay una dilatación considerable de las glándulas esofágicas. Las células del primordio genital se dividen y éste se agranda haciéndose notorio, dos ramificaciones en la hembra o formando un cuerpo alargado en el macho (Taylor y Sasser, 1983).

Cuando se completan la segunda y tercera muda en la hembra, evidenciadas por las dos cutículas desprendidas, el estilete y el bulbo esofágico medio desaparecen. Poco después de la cuarta muda el estilete y el bulbo medio son regenerados, se forman el útero y la vagina y el patrón perineal se hace visible. La hembra de la cuarta etapa continúa aumentando de grosor y un poco más de longitud, sufriendo la última muda y desarrollándose como hembra adulta, de forma piriforme. Las hembras pueden producir huevos por dos a tres meses y viven algún tiempo más después de que cesa la producción de huevos. El ciclo termina cuando la hembra pone su primer huevo (Taylor y Sasser, 1983).

Después de la segunda y tercera muda en el macho, el estilete no es visible, el bulbo esofágico medio se ha degenerado y sólo la gónada se ha alargado. Luego ocurre una rápida metamorfosis: el cuerpo alargado se desarrolla dentro de la cutícula, completo con estilete, esófago con bulbo medio, espículas, y esperma en los testículos. El macho de la cuarta etapa es vermiforme y sufre una última muda y emerge de la raíz ya como adulto. No hay evidencia de alimentación por parte de machos adultos y pueden ser encontrados en especies partenogenéticas cuando las condiciones son desfavorables para el desarrollo de la hembra, por ejemplo, cuando las densidades son muy altas y hay una limitación del suministro de alimentos. Los machos probablemente viven sólo semanas (Taylor y Sasser, 1983; Moens *et al.*, 2009).

Las especies de *Meloidogyne* tienen un ciclo de vida complejo, el segundo estado juvenil (J2) es el estado infectivo que migran a través del suelo atraídos por las raíces de las plantas hospederas. Los J2 se concentran en la zona del meristemo apical, elongación celular y cerca del punto de emergencia de las raíces laterales; usualmente penetran la raíz justo detrás de la cofia (punta de la raíz). La penetración involucra la acción mecánica del estilete y la acción de enzimas segregadas por las glándulas del esófago. Después de la penetración, los J2 migran intercelularmente primero hacia la punta de la raíz y luego hacia el tejido vascular en desarrollo hasta alcanzar el floema primario o también las células

indiferenciadas del parénquima adyacente, en donde se establecen e inician su alimentación (Dropkin, 1980; Wyss *et al.*, 1992). En respuesta a la alimentación del nematodo, el tejido de la planta experimenta cambios en su morfología y fisiología, probablemente como respuesta a las secreciones del nematodo y a sustancias producidas por la planta. Algunas células cercanas a la corteza, periciclo y parénquima cortical se dividen y alargan formando nódulos o agallas (Dropkin, 1980), transformándose en células nodriza o células gigantes, hipertrofiadas, multinucleadas, metabólicamente activas (Huang, 1985) y de donde el nematodo obtiene su alimento. La formación de estas células es de vital importancia para que el nematodo continúe su desarrollo. El J2 adquiere forma hinchada, deja de alimentarse y muda 3 veces hasta convertirse en pocos días en un macho o hembra adulta. Los machos, en la cuarta muda asumen el aspecto alargado, salen de la raíz y no se alimentan, pueden encontrarse libres en el suelo o cerca de hembras adultas. Mientras que las hembras adquieren forma de pera, con la parte anterior móvil y estrecha, y la posterior gruesa e inmóvil; reinician la alimentación en las mismas células gigantes, manteniéndose sedentarias por el resto de sus vidas. La hembra deposita entre 500 a 1000 huevos dentro de una matriz gelatinosa en la superficie de la raíz. El ciclo de vida dura entre 3 a 4 semanas en hospedantes susceptibles y suelos templados (25 – 30 °C). Masas de huevos sobreviven al estrés por humedad y las raíces infectadas podrían conservar nematodos en reproducción por largos períodos después de la cosecha (Dropkin, 1980).

#### **2.3.4. Formas de reproducción**

Existen tres tipos de reproducción dentro del género *Meloidogyne*: (a) anfigimixis, en el cual el esperma de los machos fertiliza los ovocitos en las hembras y posteriormente se produce una meiosis, (b) partenogénesis meiótica facultativa, en el cual en presencia de machos se produce una anfigimixis, pero en su ausencia, se lleva a cabo una meiosis en los ovocitos, con dos de sus núcleos, con una reducción de complemento cromosómico (el pronúcleo y el segundo cuerpo polar), posteriormente se fusionan (autogimixis), y (c) partenogénesis mitótica obligada, donde los machos no están involucrados y uno de los dos núcleos producidos durante la división mitótica inicial dentro del ovocito se deteriora y el otro se convierte en el precursor del embrión posterior (apogimixis) (Chitwood y Perry, 2009).

Las poblaciones de una misma especie de *Meloidogyne* pueden ser diferentes en el modo de reproducción, por ejemplo, 29 de las 32 poblaciones estudiadas de *M. hapla* se reprodujeron por partenogénesis meiótica facultativa, las otras por partenogénesis mitótica (Chitwood y Perry, 2009).

Tanto en el género *Meloidogyne*, como en *Globodera* y *Heterodera*, los cromosomas sexuales están ausentes y la proporción de machos y hembras puede estar influida por factores ambientales. En las especies que se reproducen por partenogénesis meiótica y mitóticas, el hacinamiento, la escasez de alimentos, las temperaturas extremas u otras tensiones ambientales adversas, pueden dar lugar a la formación de machos por inversión sexual. Estos machos raramente inseminan hembras, e incluso cuando lo hacen, una división mitótica en el ovocito inicia la embriogénesis sin fusión con el núcleo de espermatozoide (Chitwood y Perry, 2009).

#### **2.3.5. Factores del ambiente que afectan el desarrollo del nematodo**

La temperatura, la humedad, la porosidad del suelo, la disponibilidad de oxígeno y la presencia de toxinas pueden limitar o detener el movimiento, el desarrollo y la eclosión de huevos de los nematodos agalladores de la raíz (Curtis *et al.*, 2009; Evans y Perry, 2009).

La temperatura no sólo afecta la tasa de multiplicación del nematodo sino también su distribución, especialmente en relación con la capacidad de sobrevivir a los efectos de alta o baja temperatura. Dentro del género *Meloidogyne* hay dos grupos, termófilos y criófilos, según su capacidad de sobrevivir las transiciones de fase de lípidos que se producen a 10 °C. *M. chitwoodi*, *M. hapla* y *M. naasi* son criófilos y pueden sobrevivir en el suelo a temperaturas de hasta por debajo de 10 °C, mientras que *M. javanica*, *M. arenaria* y probablemente *M. exigua* son termófilos y no sobreviven en el suelo a temperaturas inferiores a 10 °C (Evans y Perry, 2009).

Wallace (1964), reconoció el papel esencial desempeñado por la humedad del suelo en la supervivencia y eclosión de los huevos de *Meloidogyne*. La sequía excesiva puede frenar o incluso matar al nematodo, igual ocurre con el encharcamiento prolongado que, por falta de oxígeno en el suelo, el nematodo es también afectado.

Todos los juveniles de segundo estado requieren una película de agua de cierto grosor para su circulación en el suelo (Curtis *et al.*, 2009).

La textura del suelo es otro factor de importancia, la distribución y la severidad del ataque del nematodo dependen de ella. El daño y pérdidas de producción por nematodos agalladores de la raíz son generalmente más severos sobre suelos de textura arenosa (Wallace, 1964), debido a que, en suelos pesados, la eclosión disminuye y el desplazamiento del nematodo se hace más lento.

### **2.3.6. Sintomatología**

El daño que ocasionan a las plantas se debe principalmente a la alteración de los tejidos vasculares de la raíz, que reduce sustancialmente la absorción de nutrientes y agua, con el consiguiente debilitamiento de la planta y disminución del rendimiento (Orton Williams, 1973; Siddiqi, 2000; Abad, *et al.*, 2003). Además, los efectos negativos de *Meloidogyne* se agravan en algunas ocasiones por interacciones con otros patógenos. Los síntomas más comunes e indirectos son la reducción del crecimiento, clorosis del follaje, susceptibilidad al marchitamiento y menor producción de frutos. La mayoría de especies de *Meloidogyne* inducen a la raíz infectada a engrosarse alrededor del punto donde el nematodo se está alimentando, formándose así el típico nódulo radicular. Los nódulos pueden presentarse simples, o varios de ellos coalescen para formar un conjunto masivo de nódulos. Algunas especies estimulan también a la planta a producir muchas raíces laterales que emergen de la agalla, lo que da por resultado un sistema radical compacto, anormalmente abundante y entrelazado. Aunque, algunas especies producen un tipo característico de nodulación, la identificación de ellas no puede hacerse basándose solamente en estos síntomas radicales (Eisenback *et al.*, 1981).

### **2.3.7. Resistencia de patrones de vid a nemátodos**

Los patrones se han utilizado en la viticultura para proteger contra plagas del suelo desde hace 150 años. Los patrones disponibles para la vid difieren en su susceptibilidad a los nematodos. La fácil propagación, la compatibilidad del portainjerto con la variedad y su adaptación a una amplia gama de condiciones del suelo son las más importantes características en la selección de patrones (Reisch *et al.*, 2012).

En los primeros estudios se seleccionaron patrones derivados de cruces interespecíficos de *Vitis* por resistencia a los nematodos parásitos, el *V. champini* cultivares Ramsey y Dog Ridge se caracterizaron por presentar una resistencia duradera a los nematodos parásitos. Las fuentes de resistencia a *Meloidogyne incognita* han sido reportados en *V. aestivalis*, *V. champinii*, *V. cinerea*, *V. mustangensis* (sin. *V. candicans*), *V. rupestris* y *Muscadinia rotundifolia*; y a *Xiphinema index* en *V. arizonica*, *V. candicans*, *V. rufotomentosa* y *M. rotundifolia* (Nesbitt, 1974; Harris, 1984; Walker *et al.*, 1994; Cousins *et al.*, 2003).

Los cultivares Harmony y Freedom resistentes al nematodo de las agallas radicales se crearon por cruces complejos entre *V. champinii*, *V. longii*, *V. vinifera*, *V. riparia* y *V. labrusca* y fueron los primeros que emergieron de un programa de mejoramiento formal (Weinberger y Harmon, 1966; Garris *et al.*, 2009; Reisch *et al.*, 2012). En general, los patrones se han desarrollado o seleccionado por resistencia a no más de una especie de nematodo. Recientemente, se han desarrollado y lanzado los patrones resistentes USDA 10-17A, USDA 10-23B, USDA 6-19B, RS-3 y RS-9 que exhiben resistencia a más de una especie de nematodo (Anwar *et al.*, 2002.; Gu y Ramming, 2005a, b). Además, la presión de selección que resulta del amplio uso del patrón Harmony ha dado lugar a la aparición patotipos virulentos a *M. incognita* y *M. arenaria* (Cañ *et al.*, 1984; Anwar y McKenry, 2002). Similares patotipos virulentos se encuentran estrechamente relacionados al patrón Freedom (Anwar *et al.*, 1999). Recientemente, Ferris *et al.* (2012) han lanzado los patrones UCD GRN1, UCD GRN2, UCD GRN3, UCD GRN4 y UCD GRN5, los cuales presentan una resistencia combinada casi completa o completa a *M. incognita* raza 3, *M. incognita* patotipo Harmony C, *M. arenaria* patotipo Harmony y *Xiphinema index*.

#### **2.4. Identificación de especies de *Meloidogyne***

Las identificaciones a nivel de especies de los nematodos formadores de agallas radicales presentan muchas dificultades. La morfología, la morfometría variable, los efectos del hospedante, la variación intraespecífica, la reproducción partenogenética, la existencia de especies crípticas y el número cada vez mayor de especies descritas, generan confusión y limitan la identificación de especies de *Meloidogyne* que dependen predominantemente de una estrategia reproductiva partenogenética (Hunt y Handoo, 2005).



La verificación de poblaciones mixtas y/o la detección de especies poco comunes requiere técnicas de identificación distintas a la prueba de hospedantes diferenciales, que incluyen las morfológicas (patrón perineal de hembras adultas, machos, forma de la región labial del J2 y hembra, morfología del estilete, longitud y forma de la cola del J2) y, en algunos casos, métodos bioquímicos o moleculares. Con el aumento del número de especies descritas los valores de muchos de estos caracteres han demostrado una gran variación intraespecífica. La técnica de la electroforesis de isoenzimas ha permitido identificar otras especies no comunes, aunque son los métodos moleculares basados en la PCR los que actualmente vienen contribuyendo a una correcta y mejor identificación de nuevas especies (Hunt y Handoo, 2005).

#### **2.4.1. Uso de patrones perineales**

El patrón perineal comprende el área del extremo de la cola, fasmidios, líneas laterales, ano y vulva; todo rodeado por pliegues o estrías cuticulares. Los caracteres morfológicos del patrón perineal usados en la identificación son: forma del diseño perineal (rectangular, circular, oval, piriforme, de reloj de arena, etc.), arco dorsal (alto, bajo redondeado, aplanado), líneas laterales (presentes o ausentes), forma de las estrías (finas, gruesas, cortas, quebradas, lisas, onduladas, en zigzag), hombreras (presentes o ausentes), puntuaciones al término de la cola (presentes o ausentes), alas en uno o a ambos lados del diseño (presentes o ausentes). Aunque, los patrones perineales de individuos y poblaciones dentro de una especie varíen, las características básicas de cada especie no lo hacen (Taylor y Sasser, 1978; Hirschmann, 1985).

#### **2.4.2. Análisis electroforéticos de proteínas e isoenzimas**

La caracterización enzimática, es un método descrito para identificar a las hembras de diversas especies de *Meloidogyne* mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Varios perfiles isoenzimáticos se han utilizado para distinguir las especies de *Meloidogyne*, la carboxilesterasa / esterasa EST (EC 3.1.1.1) resulta la más útil, otras como malato deshidrogenasa MDH (1.1.1.37), superóxido dismutasa SOD (1.15.1.1) y glutamato oxaloacetato, transaminasa GOT (EC 2.6.1.1) también se utilizan para confirmar la identificación de especies realizadas con EST y MDH. En la electroforesis, la EST o MDH se presentan como bandas de color, las cuales son especie-específicas. Dicho método es muy sensible, ya que se necesita sólo una hembra para hacer la identificación, por lo tanto, es útil para la detección temprana de mezclas de especies. La estabilidad relativa de

los fenotipos isoenzimáticos en *Meloidogyne* spp. representa una herramienta útil para la identificación del nematodo, entre los sistemas de isoenzimas, la EST tiene el valor diagnóstico más alto ya que es el fenotipo que más se ha descrito (Esbenshade y Triantaphyllou, 1985).

Los fenotipos de enzimas se designan indicando las especies de *Meloidogyne* que cada una específica y el número de bandas detectadas. Los fenotipos con el mismo número de bandas se diferencian por letras pequeñas (Esbenshade y Triantaphyllou, 1985, 1990). La comparación de perfiles electroforéticos de esterasas han demostrado gran consistencia para distinguir especies de *Meloidogyne*, sin embargo, los perfiles de malato deshidrogenasa ayudan en la identificación cuando los perfiles de esterasas son similares, caso de *M. incognita* y *M. hapla* (Williamson, 1991). Algunas 16 especies, como *M. arenaria*, muestran varios perfiles diferentes, aunque esto puede indicar la existencia de especies crípticas (Hunt y Handoo, 2009).

## CAPÍTULO 3

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Lugar y periodo de ejecución

##### 3.1.1. Ubicación geográfica de las zonas muestreadas para la obtención de poblaciones de *Meloidogyne* spp.

El trabajo de investigación se llevó a cabo entre los meses de junio de 2016 y febrero de 2017, las zonas productoras de uva de mesa muestreadas se ubican en las regiones de Piura, Lambayeque y La Libertad de la costa norte del Perú (Cuadro 1).

En campo, las muestras de raíces del cultivo se evaluaron para confirmar la presencia de las agallas típicas producidas por *Meloidogyne* spp., las cuales se codificaron de acuerdo al cultivo y lugar de procedencia.

##### 3.1.2. Fase de laboratorio

Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Nematología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Piura y en el Megalaboratorio de Biotecnología Molecular de la Universidad Nacional del Altiplano - Puno.

**Cuadro 1.** Ubicación geográfica de las principales zonas productoras de uva de mesa en el norte del Perú.

Región	Zonas productoras	Ubicación geográfica
Piura	Valle del Alto, Medio Piura y Cieneguillo	04°53'18" de latitud sur y 80°41'07" longitud oeste.
Lambayeque	Motupe y Olmos	7°14'37" de latitud sur y 80°37'23" longitud oeste.
La Libertad	Valles de Virú y Chepén	6°56'38" de latitud sur y 79°41'18" longitud oeste.

### 3.2. Muestreos

La obtención de muestras se realizó en suelos con humedad (30 a 40 % de su capacidad de campo), el número de submuestras para obtener una muestra compuesta (suelo más raíces) estuvo supeditada a la superficie de cada sito o lugar de muestreo. Las submuestras se tomaron siguiendo un esquema de muestreo sistemático en forma de V o zigzag entre las filas dentro del cultivo y a una distancia equidistante entre cada submuestra. Las submuestras se colectaron con la ayuda de una palana a una profundidad entre 20 a 30 cm colocándose en una bolsa o balde plástico. Posteriormente se mezclaron para tomar la muestra compuesta final de 1 kg más raíces (20 a 40 g). Las muestras se acondicionaron en bolsas plásticas y se etiquetaron para su traslado al laboratorio de Nematología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Piura.

### 3.3. Procesamiento y extracción de nematodos de muestras de suelo

Las muestras compuestas se conservaron a 10°C y se procesaron en los primeros 10 días de la fecha de toma de muestras en el campo. Para la extracción del J2 de *Meloidogyne* spp. del suelo se utilizó el método de flotación-centrifugación (Jenkins, 1964). La muestra de suelo se homogenizó para obtener 100 cm<sup>3</sup> (Fig. 1A), la cual se puso en un balde vacío (Fig. 1B), luego se agregó 1 litro de agua, se mezcló con la finalidad de desagregar los terrones y liberar de los nematodos en la suspensión (Fig. 1C). La suspensión se pasó a través de un tamiz de 20 Mesh (Fig. 1D), recogiendo en un balde. Posteriormente, la suspensión se vertió a través de un tamiz de 500 Mesh (Fig. 1E), lo retenido sobre el tamiz de 500 Mesh se llevó a un vaso con capacidad de 100 ml, colectándose aproximadamente 40 ml (Fig. 1 F). A los 40 ml se agregó una cuchara de caolín (Fig. 1G), se homogenizó, se llevó a un tubo y se centrifugó por 4 min a 1,750 rpm (Fig. 1H, I). En cada tubo se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y se adicionó la solución de sacarosa (500 g de azúcar disuelta en 1 L de agua) (Fig. 1J). Se centrifugó por segunda vez a 1,750 rpm por 2 min, vertiéndose cuidadosamente el sobrenadante en un tamiz de 500 Mesh, se lavó con agua para retirar la solución de sacarosa y luego colectar los nematodos en placas de vidrio para su análisis bajo el microscopio y cuantificar los nematodos presentes (Fig. 1K).



**Figura 1.** Procedimiento para la extracción de nematodos en el suelo, método de la flotación-centrifugación (Jenkins, 1964).

### 3.4. Procesamiento y extracción de huevos más J2 de *Meloidogyne* spp. de raíces

Se aplicó la técnica de la trituration-centrifugación (Coolen, 1979). Las raíces infestadas se cortaron en pedazos de aproximadamente 1cm, muestras de 10 g más una solución de hipoclorito de sodio (0.5 % NaOCl) se trituran en una licuadora por 1 min en máxima velocidad. Los restos vegetales se pasaron por un tamiz de 20 Mesh, y 500 Mesh, superpuestos uno sobre otro, Se colectó con una pizeta conteniendo agua la suspensión de nematodos contenidos en el tamiz de 500 Mesh, los cuales se depositaron en vaso de 100

ml. La suspensión se vertió en los tubos de centrifugación y se llevó a cabo el mismo procedimiento descrito en el punto 3.3.

### **3.5. Aislamiento de poblaciones**

#### **3.5.1. Obtención de poblaciones en plantas de tomate**

Como hospedante susceptible se utilizó el cultivo de tomate (*Lycopersicon sculentum* var. Rio grande). Se sembraron semillas en bandejas de germinación conteniendo turba esterilizada, las plantas se mantuvieron por un periodo de 15 días o hasta cuando tuvieron 4 hojas verdaderas. Luego se trasplantaron en macetas plásticas de 1000 cm<sup>3</sup> conteniendo una mezcla de suelo naturalmente infestado por el nematodo más restos de raíces agalladas, los cuales sobraron de la muestra procedente de campo. Las plantas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero por 45 días, se abonaron cada siete días con un fertilizante balanceado (20-10-20) soluble en agua. Huevos y juveniles en segundo estado (J2) del nematodo se extrajeron de las plantas de tomate con raíces agalladas con una solución de 0.5% de NaOCl (Hussey y Barker, 1973). Este inóculo se utilizó para los ensayos de purificación de las respectivas poblaciones del nematodo.

#### **3.5.2. Purificación de poblaciones de *Meloidogyne* spp.**

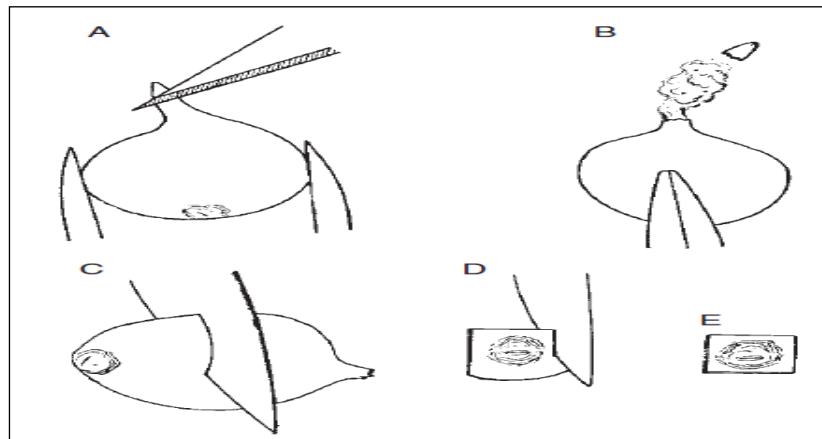
Para la purificación de cada población del nematodo se utilizó como fuente de inóculo huevos + J2 extraídos de raíces de tomate, inoculándose en plantas de tomate de 14 de días edad trasplantadas en macetas plásticas de 1000 cm<sup>3</sup> conteniendo una mezcla arena + tierra de almácigo (50/50) esterilizada. Las plantas inoculadas se mantuvieron por 45 días en invernadero, pasado este período se obtendrán las hembras del nematodo para realizar la observación de diseños perineales y caracterización bioquímica de poblaciones.

### **3.6. Observación de diseños perineales hembras de *Meloidogyne* spp. (Fassuliotis, 1979)**

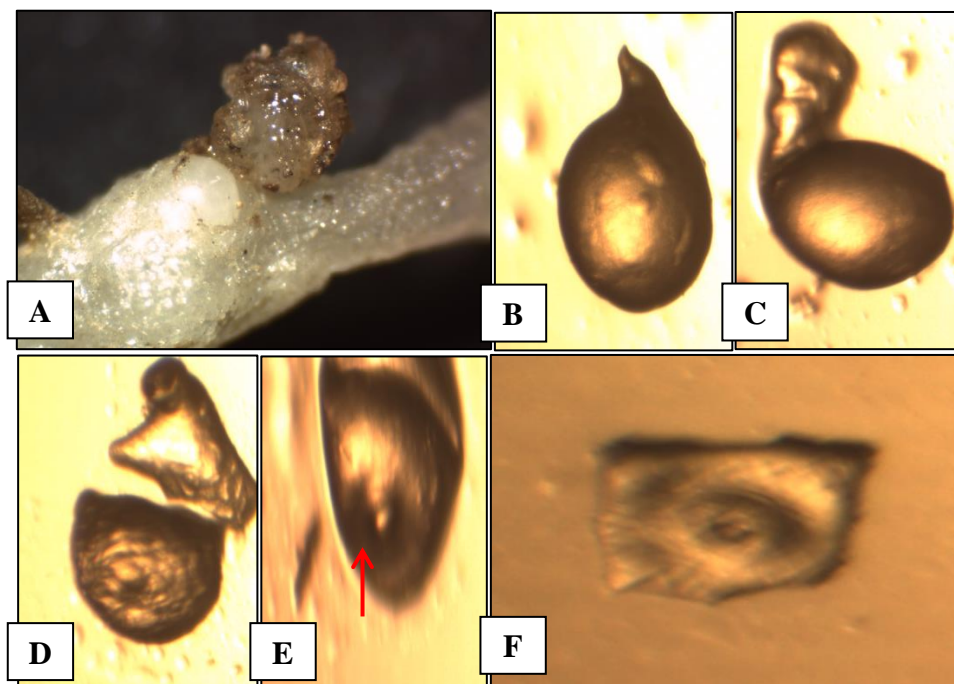
Para la caracterización morfológica a través de la configuración de la región perineal de hembras adultas se seleccionaron agallas causadas por el nematodo, con una aguja de punta fina se retiró la masa de huevos (Fig. 3A) se aislaron las hembras en una cantidad mínima de diez (Fig. 3B), se colocaron en una placa Petri conteniendo una gota de ácido láctico por un periodo de 24 h. Después, se cortó el cuello de las hembras y se apretó lentamente para que salga el contenido interno de cada hembra (Fig. 3C). Con



mucho cuidado se realizó un corte de la parte anterior de la hembra (Fig. 3D) y otro corte de forma cuadrada de la región perineal donde se indica la presencia de la punta de la cola (Fig. 3E), cada corte perineal fue transferido a una lámina y luego se selló con esmalte incoloro y observadas al microscopio para su caracterización morfológica (Fig. 3F) (Hartman y Sasser, 1985).



**Figura 2.** Técnica para la obtención de diseños de perineales de *Meloidogyne* **A:** Corte del cuello de la hembra con bisturí. **B:** Remoción del contenido interno de la hembra con una pinza. **C:** Corte de la parte anterior de la hembra **D** y **E:** Cortes en forma cuadrada de los perineales de la hembra para su posterior observación en microscopio (Taylor y Netscher, 1974).



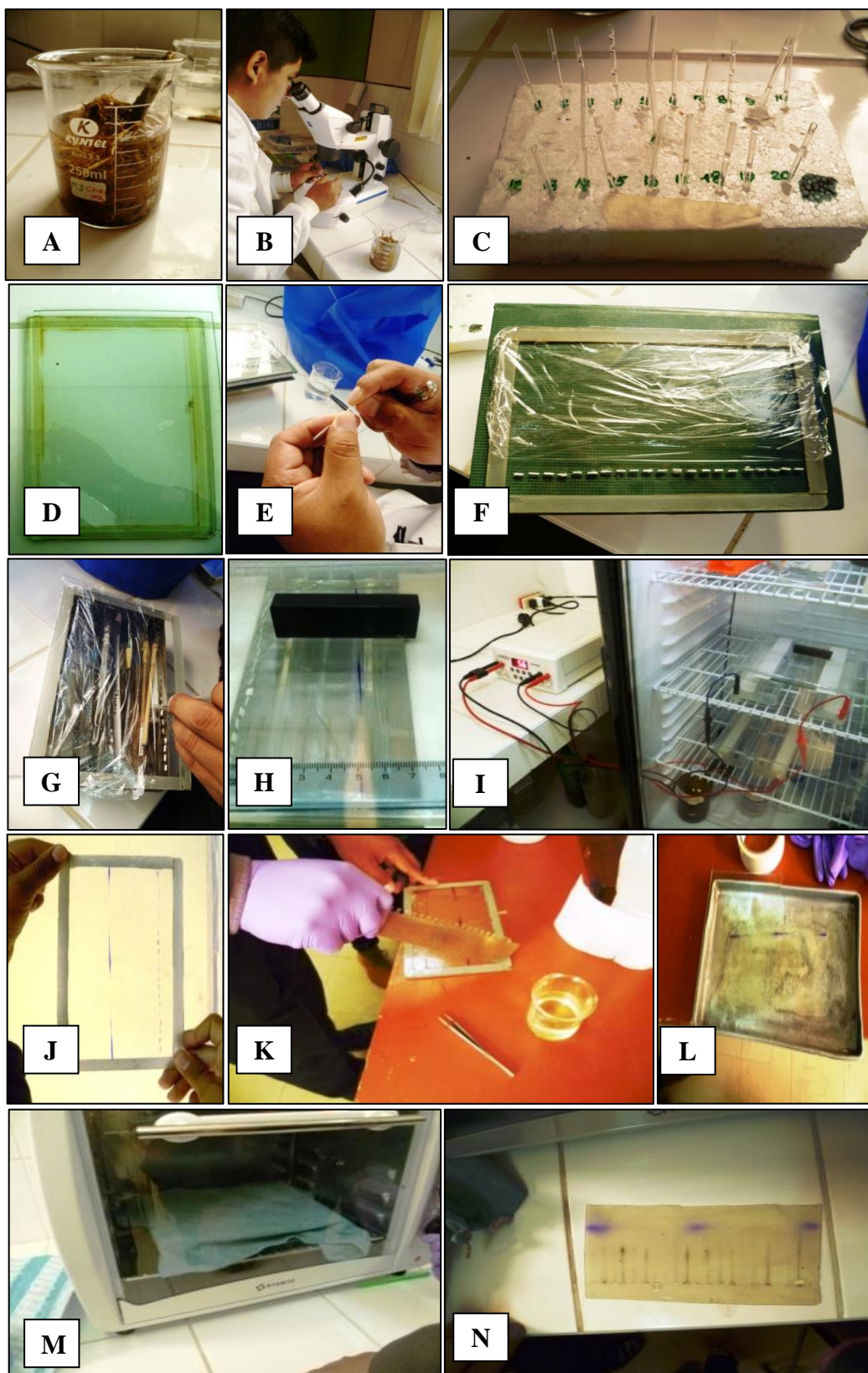
**Figura 3.** Procedimiento para la caracterización morfológica de hembras de *Meloidogyne* spp.

### 3.7. Caracterización bioquímica para especies de *Meloidogyne*.

Para la caracterización bioquímica se tomaron hembras adultas de coloración blanca lechosa de las raíces agalladas de cada población aislada de uva (Fig. 4A), con la ayuda de una aguja de punta fina en el microscopio estereoscopio (Fig. 4B), Cada hembra retirada del interior de las raíces se colocó en un tubo capilar conteniendo 2 – 3  $\mu$ L de solución tampón de extracción de enzima esterasa (tampón sacarosa) y mantenidas en hielo (Fig. 4C), (Dalmasso & Bergé, 1978). Las masas de huevos de las respectivas hembras extraídas también se colectaron y almacenaron individualmente en micro tubos (eppendorf) conteniendo solución salina al 1% para la probable purificación de especies de *Meloidogyne* detectadas en mezcla (Carneiro *et al.*, 1996).

Después de extraídas las hembras se preparó un gel de poliacrilamida al 7% (11 x 18 cm, 1 mm de espesor) (Fig. 4D), las hembras se maceraron individualmente y colocadas con ayuda de una jeringa en el papel filtro cualitativo (3 mm Whatman). Se depositó una gota de azul de bromofenol (0,01 %) en la primera, media y última muestra del respectivo gel. (Fig. 4E, F, G), Después de la aplicación de la muestra, el gel se colocó en una cuba a una fuente de 80 voltios, manteniéndose en refrigeración a 5°C (Carneiro y Almeida, 2001). Después de la migración de 5 cm del azul de bromofenol en el gel (2 horas), la potencia se apaga (Fig. 4H, I), el gel se sometió a la enzima esterasa, utilizando una solución de 50 ml de tampón fosfato (50 mg de Fast Blue RR sal y 1,5 ml de  $\alpha$ -naftil acetato 1%). (Fig. 4J, K, L), Luego, el material se llevó a la incubación, donde permaneció en una estufa a 37°C durante unos 20 a 30 minutos (Fig. 4M), hasta que las bandas esterásticas (oscuras) aparecieron sobre fondo claro (Fig. 4N), Posteriormente los geles se transfirieron a una solución que contenía 10% de ácido acético y una solución de alcohol metílico 40 % por 30 min. Después de la fijación, los geles se colocaron entre dos hojas de papel de celofán y se secaron a temperatura ambiente.

La identificación de fenotipos se realizó mediante el cálculo de la movilidad relativa (Rm) de cada banda polimórfica de la primera banda del patrón *M. javanica* Est. J3 (1.00, 1.23, 1.40) (Carneiro y Almeida, 2001). Los fenotipos enzimáticos encontrados se identificaron por una letra y un número que corresponden a la inicial del nombre específico del cultivo junto con el número de bandas, respectivamente (Esbenshade y Triantaphyllou, 1985; 1990). La aparición de diferentes fenotipos se expresa en porcentaje.



**Figura 4.** Protocolo para la obtención de los perfiles esterásicos de especies de *Meloidogyne*.

## CAPÍTULO 4

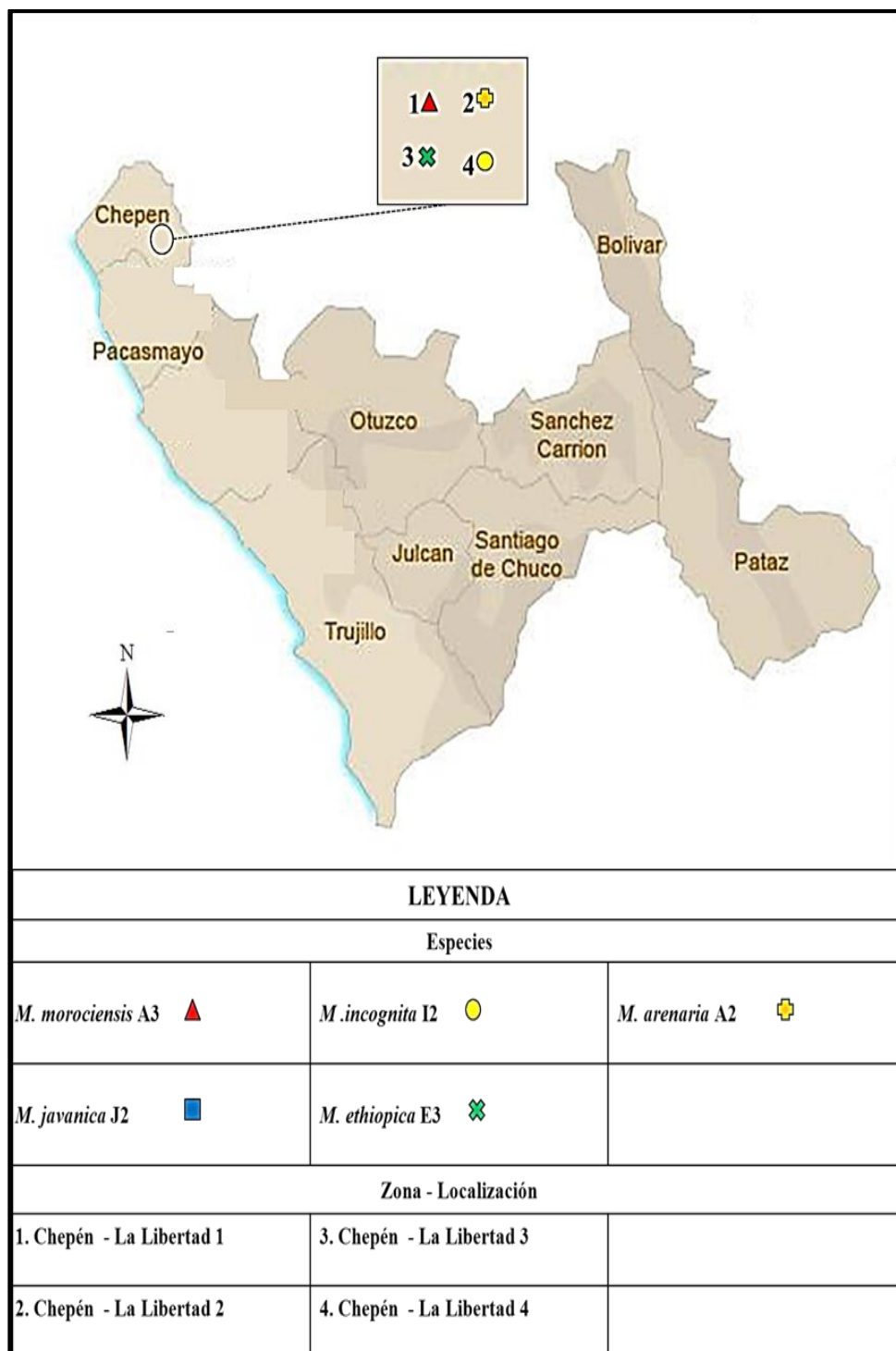
### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Obtención de poblaciones de *Meloidogyne* spp

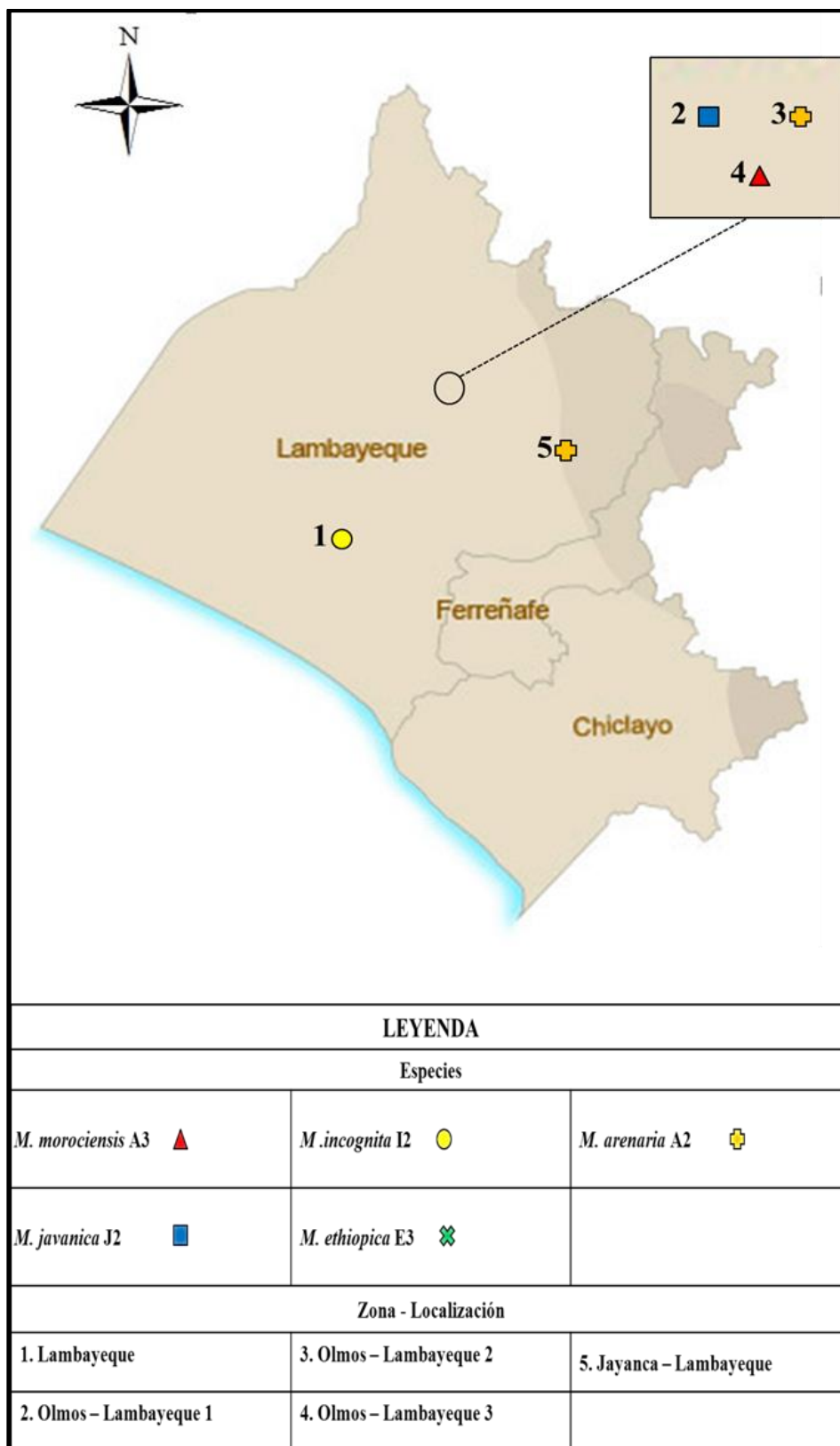
Se colectaron 14 muestras de raíces y suelo de plantas de vid en diferentes zonas productoras de las regiones de Piura, Lambayeque y La Libertad, ubicados geográficamente en la costa norte del Perú (Fig. 5, 6 y 7). En todas las muestras colectadas se observaron raíces con diferentes grados severidad de agallamiento por *Meloidogyne* spp. (Fig. 8 y 9), estimándose distintos niveles de infestación en suelo e inóculo (huevos + J2) en raíces (Cuadro 2). Las plantas afectadas por el nematodo presentan falta de vigor, brotes con entrenudos cortos y menor diámetro, hojas pequeñas y cloróticas. (Fig. 8 y 9).

**Cuadro 2.** Niveles de infestación en suelo e inóculo en 14 poblaciones de *Meloidogyne* spp. procedentes del cultivo de uva en diferentes zonas productoras de la costa norte del Perú.

Muestra	Procedencia	Nº de individuos/ 100 cm <sup>3</sup> de suelo	Huevos + J2/g de raíces
1	Chepén - La Libertad	250	5120
2	Huapalas - Alto Piura	110	1500
3	El Milagro - Alto Piura	22	1200
4	La Encantada - Alto Piura	32	1840
5	San Lorenzo - Alto Piura	95	3600
6	Tambogrande - Alto Piura	22	1700
7	San Jose - Cieneguillo Centro	200	3630
8	Jose Juan - Cieneguillo Centro	270	2100
9	Pacific - Cieneguillo Norte	186	1800
10	Tungasuca - Cieneguillo Norte	37	3600
11	Rapel - Medio Piura	35	2000
12	Lambayeque	7	900
13	Olmos – Lambayeque	70	2410
14	Jayanca – Lambayeque	40	2170

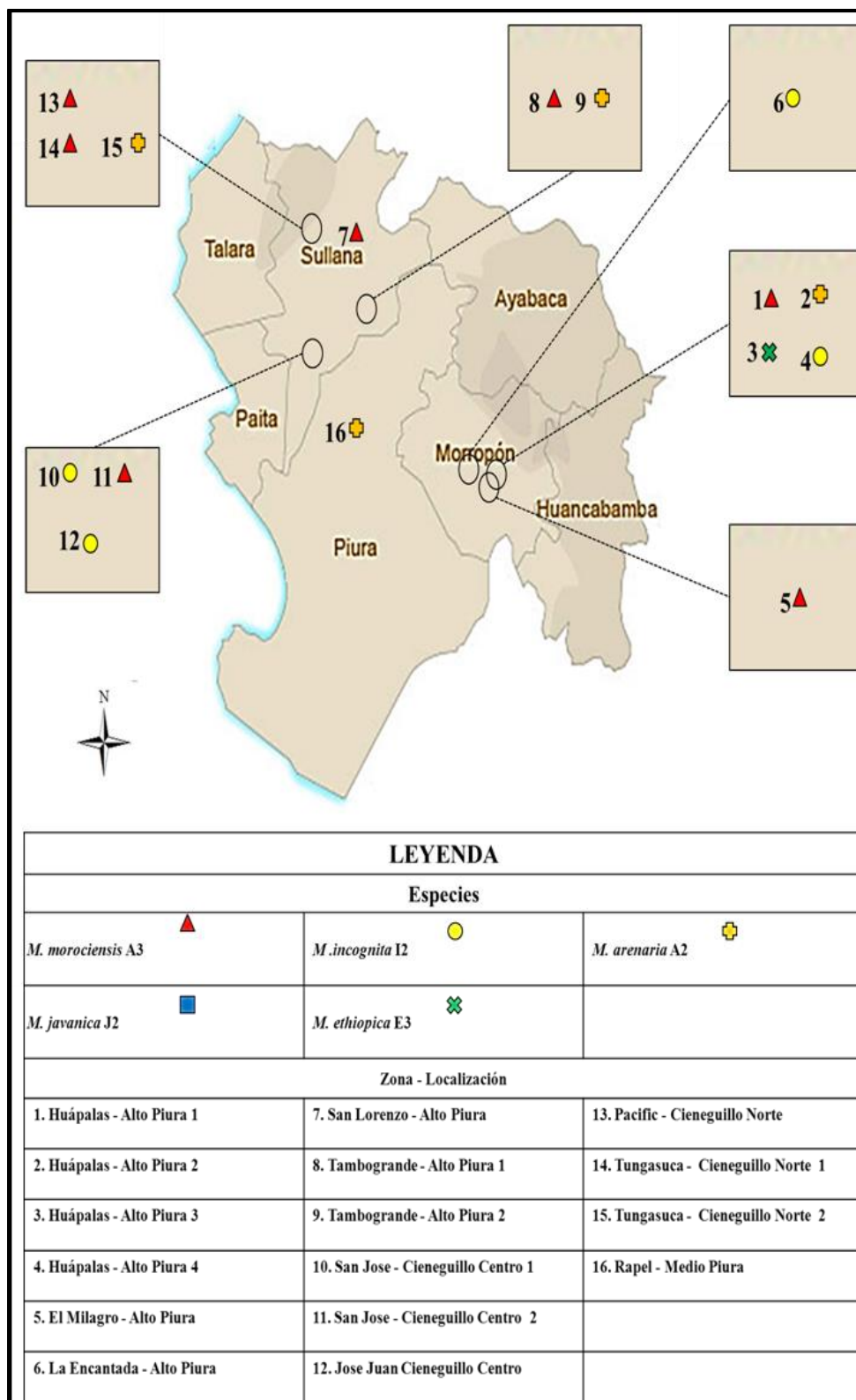


**Figura 5.** Localización y distribución de especies de *Meloidogyne* en el cultivo de uva de mesa en el distrito de Chepén, de la región La Libertad.



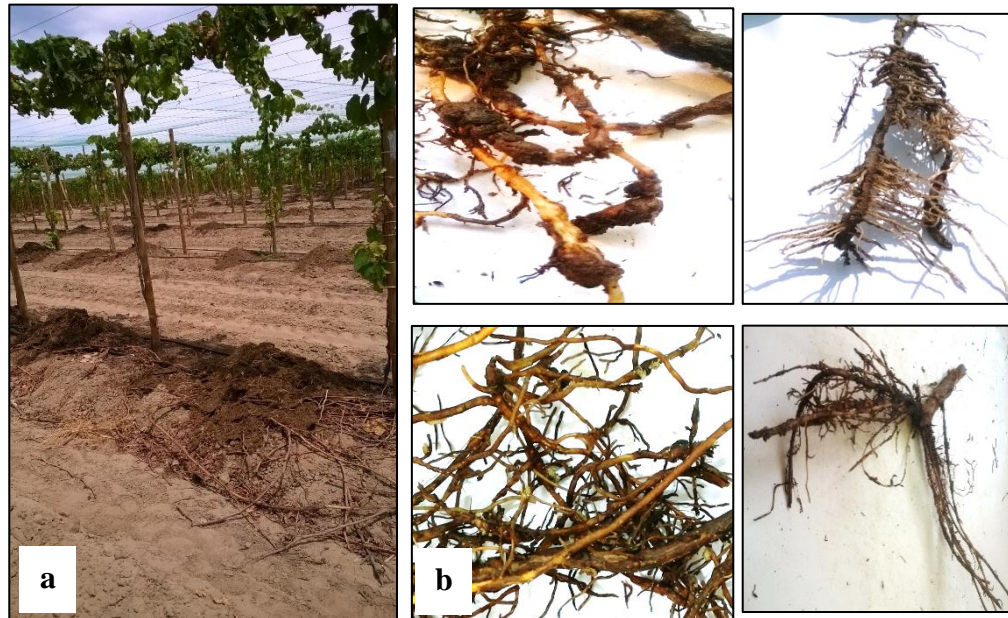
**Figura 6.** Localización y distribución de especies de *Meloidogyne* en el cultivo de uva de mesa en el distrito de Lambayeque en la región Lambayeque.





**Figura 7.** Localización y distribución de especies de *Meloidogyne* en el cultivo de uva de mesa en los distritos de Piura, Sullana y Morropón en la región Piura.

Las 14 poblaciones de *Meloidogyne* spp., se caracterizaron bioquímicamente, detectándose cinco fenotipos esterásicos entre las poblaciones procedentes de las diferentes zonas muestreadas (Cuadro 3).



**Figura 8.** Plantas de vid severamente afectadas por *Meloidogyne* spp. en un campo comercial ubicado en el valle de Cieneguillo Centro, Piura (a), raíces con diferentes grados de agallamiento causado por el nematodo (b).



**Figura 9.** Plantas de vid severamente afectadas por *Meloidogyne* spp. en un campo comercial ubicado en la región La Libertad.

#### 4.2. Caracterización bioquímica

Los cinco fenotipos de esterasa obtenidos entre las 14 poblaciones correspondieron a las especies: *M. morocciensis*. Est. A3, *M. arenaria* Est. A2, *M. incognita* Est. I2, *M. ethiopica* Est. E3 y *M. javanica* Est. J2 (Cuadro 3, Fig. 10 y 11), siendo el fenotipo A3 la especie predominante.



En la muestra procedente de la región La Libertad se detectaron poblaciones de *M. morocciensis* Est. A3 (Rm:1.15; 1.25; 1.35), *M. arenaria* Est. A2 (Rm: 1.20; 1.28), *M. ethiopica* Est. E3 (Rm: 0.91; 1.10; 1.24) y *M. incognita* Est. I2 (Rm: 1.05; 1.10). Por el porcentaje de ocurrencia de las diferentes especies del nematodo presentes en la muestra se verifica la predominancia de *M. incognita* (64.22 %) seguida y detectada en presencia de otras especies como *M. arenaria* (26.78 %), *M. ethiopica* (5.43 %) y *M. morocciensis* (3.57 %), lo que demuestra que el cultivo de uva es susceptible a varias especies del “nematodo de las agallas radicales” (Cuadro 3). Carneiro *et al.* (2007) en un estudio realizado en Chile, observaron la ocurrencia de poblaciones mixtas de *Meloidogyne* en el cultivo de vid. Investigaciones realizadas con especies de plantas perennes en otros patosistemas también se informa la ocurrencia de poblaciones mixtas en un mismo lugar, como por ejemplo en el banano (Cofcewicz *et al.*, 2004, 2005) y en el café (Carneiro *et al.*, 2005).

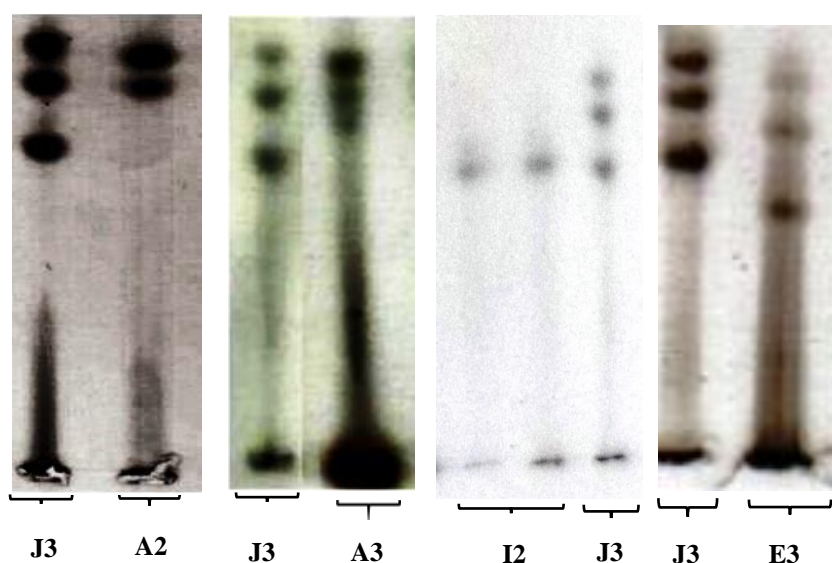
En la región Piura, se detectaron siete poblaciones de *M. morocciensis* Est. A3 que correspondieron al 70 % de las muestras analizadas. También se identificaron cuatro poblaciones de *M. arenaria* A2, una de *M. ethiopica* y cuatro de *M. incognita* las cuales correspondieron al 40, 10 y 40 % de las muestras analizadas, respectivamente. Las muestras obtenidas en los sectores: Huápalas-Alto Piura, Tambogrande-Alto Piura San José-Cieneguillo Centro y Tungasuca-Cieneguillo Centro se detectaron más de una especie del nematodo. En la región Lambayeque, se identificaron poblaciones de *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. morocciensis* (Cuadro 3). Considerándose el porcentaje de ocurrencia del nematodo en las muestras analizadas se determina que en la región Piura el *M. morocciensis* es la especie predominante en el cultivo de uva, seguida de *M. arenaria* y *M. incognita*. *M. ethiopica* sólo se detectó en el Huápalas ubicado en el valle del Alto Piura. En la región La Libertad no se observa predominancia de ninguna especie y en la región Lambayeque de las tres muestras analizadas se observa que *M. arenaria* es la que predomina. Demostrándose que, en las tres regiones ubicadas en la costa norte del Perú, la nematofauna asociada a la rizosfera de plantas de uva es diversa en especies de *Meloidogyne*.

El 64.3 % del total de muestras analizadas correspondieron al fenotipo Est A3 de *M. morocciensis*, lo que indica que esta especie es de amplia distribución geográfica en el cultivo de uva en la costa norte del Perú. En Piura se detectó en el 70 % de las muestras y predomina en los valles del Alto Piura, San Lorenzo y Cieneguillo. *M. arenaria* y *M. incognita* son las otras especies del “nematodo formador de agallas radiculares” que predominan y se encuentran diseminadas en los suelos donde se cultiva uva en las tres regiones geográficas evaluadas en el norte del Perú. Siete especies de *Meloidogyne* se han reportado afectando uva en el mundo, pero solo cuatro se consideran de importancia: *M. arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica* y *M. hapla*. Las tres primeras especies se reproducen por partenogénesis mitótica y se localizan bajo condiciones de climas Mediterráneos y calientes (Esmenjaud y Bouquet, 2009). *M. hapla* (partenogénesis meiótica o anfimixis) sólo se ha reportado en Washington (Zasada *et al.*, 2012). En este estudio se confirma y se coincide con los anteriores autores en el sentido que *M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica* se encuentran asociadas al cultivo de vid con mayor o menor predominancia en las diferentes zonas productoras del norte del Perú, caracterizadas tener climas cálidos y secos en el verano y templado en el invierno.

El fenotipo E3, característico de *M. ethiopica*, se encontró en dos muestras procedentes de dos regiones geográficamente distantes (Piura y La Libertad). Esta especie es considerada agresiva en kiwi y vid en Chile (Carneiro *et al.*, 2007), también se ha registrado su ocurrencia en Brasil (Carneiro, *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2003). Durante mucho tiempo por las características morfológicas y la configuración perineal de las hembras esta especie se confundió con *M. incognita* y *M. arenaria*, pero bioquímicamente el fenotipo esterasa E3 es específico para *M. ethiopica* y es usado para diferenciarlo de las otras especies (Carneiro *et al.*, 2004). En el Perú, Murga-Gutierrez *et al.* (2012) reportaron por primera vez la presencia *M. ethiopica* asociado al cultivo de espárrago en la región de La Libertad, estos autores aplicaron procedimientos estándares con microscopía óptica y la secuencia de las regiones del ITS1-2.

**Cuadro 3.** Fenotipos isoenzimáticos de esterasa y los porcentajes de ocurrencia por muestra observados en 14 poblaciones de *Meloidogyne* spp. provenientes de plantas de uva de mesa colectados en las regiones de La Libertad, Piura y Lambayeque en la costa norte del Perú.

Muestra	Procedencia	Ubicación Geográfica	Especie	Fenotipo esterasa	Ocurrencia %
1	Chepén	79° 23' 48.51"	<i>M. morocciensis</i>	A3	3.57
	La Libertad	7° 08' 18.36"	<i>M. arenaria</i>	A2	26.78
			<i>M. ethiopica</i>	E3	5.43
			<i>M. incognita</i>	I2	64.22
2	Huápalas	80° 11' 12.14"	<i>M. morocciensis</i>	A3	5.25
	Alto Piura	5° 07' 50.58"	<i>M. arenaria</i>	A2	45.25
			<i>M. ethiopica</i>	E3	3.45
			<i>M. incognita</i>	I2	46.05
3	El Milagro	80° 12' 18.51"	<i>M. morocciensis</i>	A3	100.0
	Alto Piura	5° 05' 18.17"			
4	La Encantada	80° 11' 53.04"	<i>M. incognita</i>	I2	100.0
	Alto Piura	5° 05' 25.81"			
5	San Lorenzo	80° 30' 29.82"	<i>M. morocciensis</i>	A3	100.0
	Piura	4° 49' 27.62"			
6	Tambogrande	80° 19' 58.73"	<i>M. morocciensis</i>	A3	2.95
	Alto Piura	4° 57' 22.11"	<i>M. arenaria</i>	A2	97.05
7	San José	80° 37' 14.09"	<i>M. incognita</i>	I2	92.3
	Cieneguillo	4° 55' 39.13"	<i>M. morocciensis</i>	A3	7.7
	Centro				
8	José Juan	80° 37' 18.40"	<i>M. incognita</i>	I2	100.0
	Cieneguillo	4° 57' 35.73"			
9	Pacific	80° 33' 07.39"	<i>M. morocciensis</i>	A3	100.0
	Cieneguillo	4° 47' 59.97"			
10	Tungasuca	80° 39' 25.47"	<i>M. morocciensis</i>	A3	50.0
	Cieneguillo	5° 01' 48.08"	<i>M. arenaria</i>	A2	50.0
11	Rapel	80° 36' 08.14"	<i>M. arenaria</i>	A2	100.0
	Medio Piura	5° 03' 58.78"			
12	Lambayeque	79° 26' 08.78"	<i>M. incognita</i>	I2	100.0
		6° 39' 40.53"			
13	Olmos	79° 59' 56.10"	<i>M. javanica</i>	J2	25.5
	Lambayeque	6° 08' 38.40"	<i>M. arenaria</i>	A2	50.0
			<i>M. morocciensis</i>	A3	24.5
14	Jayanca	79° 45' 53.02"	<i>M. arenaria</i>	A2	100.0
	Lambayeque	6° 20' 04.70"			



**Figura 10.** Geles conteniendo perfiles esterásicos detectados en 14 poblaciones de *Meloidogyne* spp. provenientes del cultivo de uva de mesa en las diferentes regiones geográficas de la costa norte del Perú. *M. javanica* (J3); *M. arenaria* (A2), *M. morocciensis* (A3), *M. incognita* (I2) y *M. ethiopica* (E3).

N° banda	Rm	<i>M. javanica</i>	<i>M. morocciensis</i>	<i>M. arenaria</i>	<i>M. incognita</i>	<i>M. ethiopica</i>
1	0.91	— <sup>11</sup>				
2	1.00		— <sup>10</sup>			
3	1.05			— <sup>9</sup>		
4	1.10	— <sup>8</sup>	— <sup>8</sup>			— <sup>7</sup>
5	1.15			— <sup>6</sup>		
6	1.20		— <sup>5</sup>			
7	1.24				— <sup>4</sup>	— <sup>4</sup>
8	1.25				— <sup>3</sup>	
9	1.28	— <sup>2</sup>				
10	1.35					— <sup>1</sup>
11	1.40					
Est		J3	A3	A2	I2	E3

**Figura 11.** Movilidad relativa (Rm) y fenotipos de esterasa (Est) detectados en 14 poblaciones de *Meloidogyne* spp. aisladas del cultivo de uva en diferentes regiones geográficas de la costa norte del Perú.

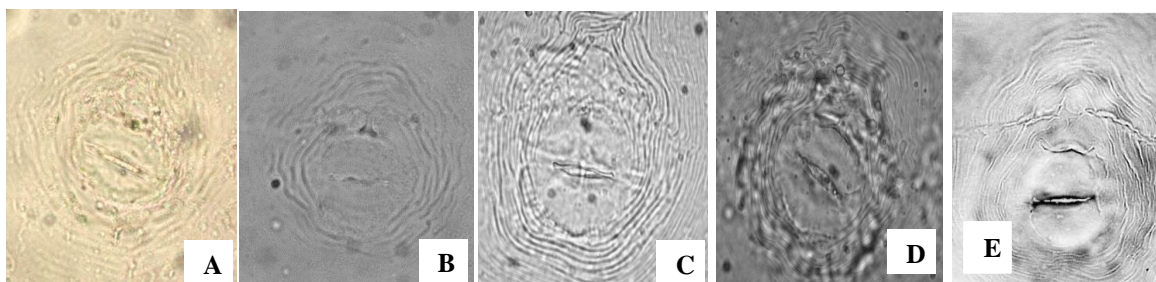
En este estudio, *M. ethiopica* se identificó en dos muestras y en mezcla con otras especies del nematodo y en un mínimo porcentaje de ocurrencia. Se necesitan realizar ensayos de patogenicidad para comprobar su agresividad en el cultivo de uva. Se conoce que *M. ethiopica* es una especie muy agresiva y polífaga, con un alto potencial de diseminación global y causar un significativo impacto sobre importantes cultivos (Lima, *et al.*, 2009; Strajnar, *et. al*, 2011; Conceição, *et al.*, 2012). En Brasil, su presencia se deba probablemente a que se introdujo a través de plantas importadas desde Chile (Carneiro, *et al.*, 2003). Debido a su detección en plantas de tomate en Eslovenia (Sirca, *et al.*, 2004) y sobre kiwi y maíz en Grecia (Conceição, *et al.*, 2012) y además del hallazgo que *M. ethiopica* es capaz de sobrevivir a temperatura bajo cero en campo abierto (Strajnar, *et. al*, 2011), hace que este patógeno sea una amenaza no solo en la regiones tropicales y subtropicales sino en también Europa (Correa, *et al.*, 2014). En el Perú, este es el primer reporte de *M. ethiopica* asociado al cultivo de uva.

*M. morocciensis* es la especie predominante y de mayor ocurrencia (100 %) en varias zonas productoras de uva de la región Piura, en otras zonas de las regiones de Lambayeque y La Libertad se identifica en mezcla con otras especies (Cuadro 3). *M. morocciensis* es descrita como una nueva especie a partir de muestras de portainjerto de melocotonero procedentes de Marruecos. *M. morocciensis* presenta una combinación de características morfológicas similares a *M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica* no obstante su fenotipo de esterasa (Fig. 10) es semejante al fenotipo de *M. arenaria* (A2) (Rammah y Hirschmann, 1990). Pocas referencias se conocen sobre la ocurrencia de *M. morocciensis* en el mundo. Brasil es el país que mayores reportes ha realizado sobre esta especie, se ha asociado al cultivo de soya (Castro *et al.*, 2003; Mattos *et al.*, 2016; Kirsch *et al.*, 2016), papa (Lima-Medina *et al.*, 2016), vid (Somavilla, 2011), kiwi, lechuga y tomate (Gomes *et al.*, 2005; Carneiro *et al.*, 1996).

#### **4.3. Caracterización morfológica**

La configuración de la región perineal de las poblaciones caracterizadas como *M. incognita* Est. I2 presentan arco dorsal alto y trapezoidal, estrías onduladas y bifurcación en la región de los campos laterales, características típicas de la especie (Fig. 12 A). El patrón perineal de *M. morocciensis* Est. A3 es oval con un arco dorsal moderadamente alto, estrías espaciadas y sin líneas laterales (Fig. 12 B). La configuración perineal de las poblaciones Est. A2 presentan arco dorsal bajo, de trapezoidal a redondo, líneas laterales

presentes y visibles. Las estrías cuticulares de la región dorsal poco onduladas, cortas, configuración perineal semejante a *M. arenaria* (Fig. 12 C). *M. ethiopica* Est. E3 presentan un patrón perineal de redondo a cuadrado, arco dorsal moderadamente alto, estrías gruesas y separadas, lisas a onduladas (Fig. 12 D). *M. javanica* Est. J3 presentan un patrón perineal con un campo lateral marcado con profundas incisuras (Fig. 12 E) (Hunt y Handoo, 2005).



**Figura 12.** Patrones perineales de cinco especies de *Meloidogyne*. A: *M. incognita*; B: *M. morocciensis*; C: *M. arenaria*; D: *M. ethiopica* y E: *M. javanica*; detectadas en el cultivo de uva de mesa en las diferentes regiones geográficas en la costa norte del Perú.

En el presente estudio, se constató que en ocho muestras predominaron especies únicas de *Meloidogyne*. *M. morocciensis* se observó en tres zonas productoras de la región Piura, *M. incognita* se identificó en dos zonas de la región Piura y otra en la región Lambayeque y *M. arenaria* una la región Piura y la otra en la región Lambayeque. La ocurrencia de poblaciones mixtas se observó en la región La Libertad con la predominancia de *M. incognita* y en una muestra de la región Piura (Huápalas, Alto Piura) también se detectaron poblaciones mixtas con una dominancia compartida entre *M. incognita* y *M. arenaria* (Cuadro 3).

Los resultados obtenidos en esta investigación son importantes por la escasez de informaciones relacionadas a la ocurrencia de nematodos, especialmente de especies de *Meloidogyne*, en el cultivo de uva en la costa norte del Perú. Aunque no se han logrado mapear otras destacadas zonas productoras, se demuestra la existencia de cinco especies de *Meloidogyne* asociadas a la rizosfera de este cultivo. En ese sentido, la identificación correcta de especies de estos patógenos es una herramienta indispensable para diseñar los programas de manejo de este nematodo en suelos infestados, tomando en consideración que se debe hacer la elección correcta de plantas para la rotación de cultivos o de cobertura y el uso de patrones resistentes adecuados.

## CAPÍTULO 5

### 5. CONCLUSIONES

1. Se identificaron 5 especies de *Meloidogyne* asociadas al cultivo de uva de mesa en la costa norte del Perú. *M. morocciensis*, con fenotipo A3 es la especie más frecuente, seguida de *M. incognita* con fenotipo I2 y *M. arenaria* con fenotipo A2.
2. En la región Piura el *M. morocciensis* es la especie predominante en el cultivo de uva de mesa, seguida de *M. arenaria* y *M. incognita*. *M. ethiopica* sólo se detectó en el sector Huápalas ubicado en el valle del Alto Piura. Siendo este el primer reporte de *M. ethiopica* asociada al cultivo de uva de mesa.
3. Diferentes especies como *M. morocciensis*, *M. arenaria*, *M. ethiopica*, *M. incognita* se encontraron asociadas o en mezcla en el cultivo de vid, (muestras procedentes de Huápalas en el valle del Alto Piura, así como en la zona de Chepén) en la Región La Libertad.
4. En la región La Libertad no se observa predominancia de ninguna especie y *M. arenaria* predomina en dos de las tres muestras analizadas procedentes de la región Lambayeque.
5. En la región Piura se obtuvieron densidades poblacionales de 22 a 270 individuos/100cc Suelo y 1200 a 3630 Huevos + J2/ gr. raíz; en la región Lambayeque se obtuvieron de 7 a 70 individuos/100cc Suelo y 900 a 2410 Huevos + J2/ gr. raíz; mientras que la región La Libertad reportó una densidad de 250 individuos/100cc Suelo y 5120 Huevos + J2/ gr. raíz.

## CAPÍTULO 6

### 6. RECOMENDACIONES

- a. Realizar ensayos de patogenicidad con las diversas especies de *Meloidogyne* identificadas en el cultivo de uva de mesa para determinar los niveles de severidad, utilizando diferentes patrones y variedades.
- b. Realizar muestreos nematológicos en otras áreas geográficas del norte del Perú para estimar la ocurrencia, distribución y abundancia de *Meloidogyne* spp.
- c. Aislar poblaciones de *Meloidogyne* spp. en otras áreas geográficas del norte del Perú para identificar especies asociadas.



## CAPÍTULO 7

### 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Abad, P., Favery, B., Rosso, M., and Castagnone-Sereno, P. 2003.** Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. *Molecular Plant Pathology* 4: 217–224.

**Abad, P; Castagnone-Sereno, P; Rosso, M.N., De Almeida, J. and Favery, B. 2009.** Invasion, feeding and development. In Perry, RN; Moens, M; Starr, JL. eds. *Rootknot nematodes*. London, UK. CAB International. p. 163-176.

**ADEX, 2016.** Disponible en <https://elcomercio.pe/economia/peru/minagri-peru-quinto-exportador-uvas-nivel-mundial-noticia-482502>

**Anwar, S. A., and McKenry, M. V. 2002.** Developmental response of a resistance breaking population of *Meloidogyne arenaria* on *Vitis* spp. *Journal of Nematology* 34:28–33.

**Anwar, S. A., McKenry, M. V., and Kaku, S. 1999.** Resistance of ten grape rootstocks against six *Meloidogyne* spp. *Journal of Nematology* 31:522.

**Anwar, S. A., McKenry, M., and Ramming, D. 2002.** A search for more durable grape rootstock resistance. *American Journal of Enology and Viticulture* 53:19–23.

**Arias M, Navacerrada G. 1973.** Geographical distribution of *Xiphinema* Cobb in Spanish vineyards. *Nematol. mediterr.* 1, 28-35.

**Brown, D. J., Dalmasso, A., and Trudgill, D. L. 1993.** Nematode pests of soft fruits and vines. Pages 427-462 in: *Plant-Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture*. K. Evans, D. L. Trudgill, and J. M. Webster, eds. CAB International, Wallingford, UK.

**Caín, D. W., McKenry, M. V., and Tarailo, R. E. 1984.** A new pathotype of root-knot nematode on grape rootstocks. *Journal of Nematology* 16:207–208.

**Carneiro, R. M. D. G., M. R. A. Almeida, M.R.A., e R, G, Carneiro. 1996.** Enzyme phenotypes of Brazilian populations of *Meloidogyne* spp. *Fundamental and Applied Nematology*, 19(6):555-560.

**Carneiro, R.M.D., Almeida, M.R.A., Guedes, A.C. 2004.** Detecção de *Meloidogyne ethiopica* e *M. javanica* em yacon no distrito federal. In: XXXVII Congresso Brasileiro de Fitopatologia (resumo). *Revista fitopatologia Brasileira* 29: 82.

**Carneiro, R.M.D.G. & Almeida. M.R.A. 2001.** Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides das galhas para identificação de espécies. *Nematologia Brasileira*. V.25, n.1, p.35 – 44.

**Carneiro, R.M.D.G., Almeida, M.R.A., Cofcewicz, E.T., Magunacelaya, J.C., and Aballay, E. 2007.** *Meloidogyne ethiopica*, a major root-knot nematode parasitising *Vitis vinifera* and other crops in Chile. *Nematology* 9: 635-641.

**Carneiro, R.M.D.G., Gomes, C.B., Almeida, M.R., Gomes, A.C.C., and Martins, I. 2003.** Primeiro registro de *Meloidogyne ethiopica* Whitehed, 1968 em plantas quivi no Brasil e reação em diferentes plantas hospedeiras. *Rev. Nematologia Brasileira* 27: 152-158.

**Carneiro, R.M.D.G., Randig, O., Almeida, M.R.A. & Gonçalves, W. 2005.** Identification and characterization of *Meloidogyne* species on coffee from São Paulo and Minas Gerais states of Brazil using esterase phenotypes and SCAR-PCR multiplex. *Nematologia Brasileira* 29:233-242.

**Castro, J. M. C., R. D. Lima, e R. M. D. G. Carneiro. 2003.** Variabilidade isoenzimática de populações de *Meloidogyne* spp. provenientes de regiões brasileiras produtoras de soja. *Nematologia Brasileira* 27:1-12.

**Chitwood, DJ; Perry, RN. 2009.** Reproduction, Physiology and Biochemistry. In Perry, R; Moens, M; Starr, J. eds. Root-knot nematodes. London, UK. CAB International. p. 182-194.

**Cofcewicz, E.T., Carneiro, R.M.D.G., Castagnone-Sereno, P., and Quénéhervé, P. 2004.** Enzyme phenotypes and genetic diversity of root-knot nematodes parasitising *Musa* in Brazil. *Nematology* 6: 85-95.

**Cofcewicz, E.T., Carneiro, R.M.D.G., Randig, O., Chabrier, C., and Quénéhervé, P. 2005.** Diversity of *Meloidogyne* spp. on *Musa* in Martinique, Guadeloupe and French Guiana. *Journal of Nematology* 37: 313-322.

**Colapietra, M. y Sicuro, G. 2001.** L'impiego de ifitoregolatori per migliorare la produzione italiana di Thompson Sedles (Sultanina). *Rivista di frutticoltura e di ortofloricoltura* 63(12): 55 – 60.

**Conceição, I.L., Tzortzakakis, E.A, Gomes, P., Abrantes, I., da Cunha, M.J. 2012.** Detection of the root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica* in Greece. *European Journal of Plant Pathology* 134: 451–457.

**Coolen, W.A. 1979.** Methods for the extraction of *Meloidogyne* spp. and other nematodes from roots and soil. In: Lamberti, F. and Taylor, C.E. (eds) Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* Species) Systematics, Biology and Control. Academic Press, London, pp. 317–329.

**Correa, V.R. Mattos, V.S., Almeida, M.R.A., Santos, M.F.A., Tigano, M.S., Castagnone-Sereno, P., and Carneiro R.M.D.G. 2014.** Genetic diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica* and development of a species-specific SCAR marker for its diagnosis. *Plant Pathology* 63: 476-483.

**Cousins, P., Lauver, M., and Boyden, L. 2003.** Genetic analysis of root-knot nematode resistance derived from *Vitis mustangensis*. Paper presented at the 8th International Conference on Grape Genetics and Breeding, Kecskemet, Hungary, August 2002. *Acta Horticulturae* 603:149–154.

**Curtis, R., Robinson, A., and Perry, R. 2009.** Hatch and host location. In: Perry, RN; Moens, M; Starr, JL .eds. Root-knot nematodes. London, Uk. CAB International 139-155 p.

**Dalmaso, A & Bergé, J.B. 1978.** Molecular polymorphism and phylogenetic relationship in some *Meloidogyne* spp. em áreas produtoras de banana no Brasil. Nematologia Brasileira, v.25, p.126.

**Dropkin, V. H. 1980.** Introduction to Plant Nematology. Department of Plant Pathology, University of Missouri, Columbia. 293 pp.

**Eisenback, J. D., H. Hirschmann, J. N. Sasser, and A. C. Triantaphyllou. 1981.** A guide to the four most common species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.), with a pictorial key. Departament of Plant Pathology, North Carolina State University/USAID. North Carolina State Graphics, Raleigh.

**Esbenshade, P.R., and Triantaphyllou, A.C. 1985.** Use of enzyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. Journal of Nematology 17: 6 – 20.

**Esbenshade, P.R., and Triantaphyllou, A.C. 1990.** Isozyme phenotypes for the identifications of *Meloidogyne* species. Journal of Nematology 22: 10 – 15.

**Esmenjaud, D., and Bouquet, A. 2009.** Selection and application of resistant germplasm for grapevine nematodes management. Pp. 195– 241 in A. Ciancio and K. G. Mujerji, eds. Integrated management of fruit crops and forest nematodes, vol. 4. Dordrecht, the Netherlands: Springer Science+Business Media.

**Evans, A. y Perry, R. 2009.** Survival mechanisms. In Perry, RN; Moens, M; Starr, JL. Eds. Root-knotnematodes, London, UK. 201-219 p.

**Fassuliotis, G.1979.** Plant breeding for root-knot nematode resistance. In: Lambert, F. y Taylor, C.E. Ed. Root-knot nematode (*Meloidogyne* species). Systematics, Biology and Control. London: *Academic Press*. 425-453 p.

**Ferris, H., and McKenry, M. V. 1975.** Relationship of grapevine yield and growth to nematode densities. *Journal of Nematology* 7: 295-304.

**Ferris, H., Zheng, L., and Walker, M. A. 2012.** Resistance of Grape Rootstocks to Plant-parasitic Nematodes. *Journal of Nematology* 44:377–386.

**Garris, A., Cousins, P., Ramming, D., and Baldo, A. 2009.** Parentage analysis of Freedom rootstock. *American Journal of Enology and Viticulture* 60:357–361.

**Gomes, C. B., S. D. S. Anjos, A. D. Campos, I. L. Medina, D. L. Lima. 2005.** Danos causados por *Meloidogyne arenaria* e *M. incognita* em tomateiro, em Rio Grande-RS. In: XXXVIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2005, Brasília-DF. Tropical Plant Pathology (Impresso). Brasília-DF: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2005. v. 30. p. 167.

**Gu, S., and Ramming, D. 2005a.** Viticultural performance of Syrah grapevines on new USDA-ARS rootstocks for winegrape production in the San Joaquin Valley. *American Journal of Enology and Viticulture* 56:312A.

**Gu, S., and Ramming, D. 2005b.** Viticultural performance of Thompson Seedless grapevines on new USDA-ARS rootstocks for raisin production in the San Joaquin Valley. *American Journal of Enology and Viticulture* 56:312A.

**Harris, A. R. 1984.** Resistance of some *Vitis* rootstocks to *Xiphinema index*. *Journal of Nematology* 15:405–409.

**Hartman, K. M., and Sasser, J. N. 1985.** Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: An Advanced treatise on *Meloidogyne*. Vol. II Methodolgy. (Barker, K. R., Carter, C. C., and Sasser., eds). North Carolina University Graphics, pp. 69-71.

**He, B; Magill, C; Starr, JL. 2005.** Laser capture microdissection and real-time PCR for measuring mRNA in giant cells induced by *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology* 37, 308–312.

**Hidalgo, L. 1999.** Tratado de viticultura general. Madrid. Ediciones Mundi –Prensa.1147 p.

**Hirschmann, H. 1985.** The genus *Meloidogyne* and morphological characters differentiating its species. In Sasser, JN; Carter, CC. eds. An Advanced Treatise on Meloidogyne. v. 1: Biology and Control. North Carolina. USA. Dept. Plant Pathology and United State Agency for International Development. North Carolina State University Graphics. p. 79-93.

**Huang, C. S. 1985.** Formation, anatomy and physiology of giant cells induced by root-knot nematodes. In J.N. Sasser, C.C. and Carter, Eds, An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. North Carolina State University Graphics, Raleigh, pp. 155-164.

**Hunt, D.J., and Handoo, Z.A. 2005.** Taxonomy, identification and principal species. In Perry, R.; Moens, M; Starr, J. eds. Root-knot nematodes. London, UK. CAB International. pp. 55-97.

**Hunt, DJ; Handoo, ZA. 2009.** Taxonomy, identification and principal species. In Perry, R.; Moens, M; Starr, J. eds. Root-knot nematodes. London, UK. CAB International. p. 55-88.

**Hussey, R. S. and K. R. Baker. 1973.** A comparision of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. Plant Disease 57: 1025-1028.

**Hussey, RS; Janssen, G. 2001.** Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species. In Starr, J; Cook, R; Bridge, J. eds. Plant Resistance to Parasitic Nematodes. London, UK. CAB International. p. 43-70.

**Hussey, RS; Mims, CW. 1991.** Ultraestructure of esophageal glands and their secretory granules in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Protoplasma 156:9-18.

**Hussey, RS; Williamson, VM. 1998.** Physiological and Molecular Aspects of Nematode Parasitism. In Barker, KR; Pederson, GA; Windham, GL. eds. Plant 83 and Nematode Interactions. Madison, Wisconsin, USA. American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc. p. 87-108.

**Jenkins, W. 1964.** A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. . Plant disease reporter, v. 48. 692 p.

**Karssen, G; Moens, M. 2006.** Root-knot nematodes. In Perry, RN; Moens, M. eds. Plant Nematology. London, UK. CAB International. p. 59-88.

**Kirsch, V.G., Kulczynski, S.M., Gomes, C.B., Bisognin, A.C., Gabriel, M., Bellé, C e Lima-Medina, I. 2016.** Caracterização de espécies de *Meloidogyne* e de *Helicotylenchus* associadas à soja no Rio Grande do Sul. Nematropica 46:197-208.

**Lamberti, F. 1979.** Economic importance of *Meloidogynespp.* in subtropical and Mediterranean climates. 341-357. In: Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* Species) Systematics, Biology and Control. F. Lambert y C.E. Taylor, eds. Academic Press, New York.

**Lima, E.A., Mattos, J.K., Moita, A.W., Carneiro, R.G., Carneiro, R.M.D.G., 2009.** Host status of different crops for *Meloidogyne ethiopica* control. Tropical Plant Pathology 34: 152–157.

**Lima-Medina, I., C. Bellé, V. H. Casa-Coila, A. da S. Pereira, e C. B. Gomes. 2016.** Reação de cultivares de batata aos nematoide das galhas. Nematropica 46:188-196.

**Loubser, J.T. 1988.** Occurrence and pathogenicity of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species) in South African vineyards. S. Afr. J. Enol. Vitic. 9: 21-27.

**Mattos, V. S., C. Furlanetto, J. P. G. Silva, D. F. dos Santos, M. R. A. Almeida, V. R. Correa, A. W. Moita, P. Castagnone-Sereno, e R. M. D. G. Carneiro, 2016.** *Meloidogyne* spp. Populations from native Cerrado and soybean cultivated areas: genetic variability and aggressiveness. Nematology 18:505-515.

**Moens, M; Perry, RN; Starr, JL. 2009.** Meloidogyne species - a diverse group of novel and important plant parasites. In Perry, RN; Moens, M; Starr, JL. eds. Rootknot nematodes. London, UK. CAB International, p. 1-13.

**Murga-Gutierrez S. N., Colagiero, M. Rosso, L. C. Finetti Sialer, M. M., and Ciano A. 2012.** Root-knot nematodes from asparagus and associated biological antagonists in Peru. Nematropica 42:57-62.

**Nesbitt, W.B. 1974.** Breeding resistant grape rootstocks. HortScience 9:359–361.

**Orton Williams, K.J. 1973.** *Meloidogyne incognita*. C.I.H. Descriptions of Plant Parasitic Nematodes, Set 2, N° 18, 4 pp.

**Pinkerton, J.N., Schreiner, R.P., Ivors, K.L., and Vasconcelos, M.C. 2004.** Effects of *Mesocriconema xenoplax* on *Vitis vinifera* and Associated Mycorrhizal Fungi. J. Nematol. 36:193-201.

**Pinochet, J., and Cisneros, T. 1986.** Seasonal fluctuations of nematode populations in three Spanish vineyards. Revue Nématology. 9:391-398.

**Rammah, A., and Hirschmann, H. 1990.** *Meloidogyne morocciensis* n. sp. (Meloidogyninae), a Root-knot Nematode from Morocco. Journal of Nematology 22: 279-291.

**Ramsey, K; Wang, Z; Jones, MGK. 2004.** Using laser capture microdissection to study gene expression in early stages of giant cells induced by root-knot nematodes. Molecular Plant Pathology 5,587–592.

**Reisch, B.I., Owens, C.L., and Cousins, P.S. 2012.** Grape. Pp 225–262 in Badenes, M. L., and Byrne, D. H. eds. Fruit Breeding, Handbook of Plant Breeding 8, Springer Science Business Media, LLC.

**Reynier, A. 1995.** Manual de viticultura. Quinta edición. Bilbao. Ediciones Mundi – Prensa. 407p.



**Reynolds, A.G. and D.A. Wardle. 2001.** Rootstocks impact vine performance and fruit composition of grapes in British Columbia. HortTechnol. 11:419-427.

**Sasser J.N. 1980.** Root-Knot nematodes: a global menace to crop production. Plant Disease 64: 36-41.

**Siddiqi, M.R. 2000.** Tylenchida Parasites of Plants and Insects. CABI, UK, 833 pp.

**Sirca, S., Urek, G., and Karssen, G. 2004.** First report of the root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica* on tomato in Slovenia. Plant Disease 88: 680.

**Somavilla, L. 2011.** Levantamento, caracterização do nematoide das galhas em videira nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina e estudo da resistência de porta-enxertos a *Meloidogyne* spp. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Pelotas – Pelotas.

**Strajnar, P., Sirca, S., Knapic, M, and Urek, G., 2011.** Effect of Slovenian climatic conditions on the development and survival of the root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica*. European Journal of Plant Pathology 129, 81–88.

**Taylor, A. L. y J. N. Sasser. 1983.** Biología, identificación y control de los nemátodos de nódulo de la raíz (especies de *Meloidogyne*). Ed. Universidad de Carolina del Norte. 111p.

**Taylor, A., y Sasser, J. 1978.** Biología, identificación y control de los nemátodos del nódulo de la raíz. Proyecto Internacional de *Meloidogyne*. North Carolina. EE.UU.: Publicación Cooperativa entre el Departamento de Fitopatología de la Universidad del Estado.

**Taylor, D.P., and Netscher, C. 1974.** An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. . Nematologica 20. 268-269 p.

**Walker, M. A., Ferris, H., and Eyre, M. 1994.** Resistance in *Vitis* and *Muscadinia* species to *Meloidogyne incognita*. Plant Disease 78:1055–1058.

**Wallace, H. 1964.** The biology of plant parasitic nematodes. London, UK. Edward Arnold. 280 p.

**Weaver, R.J. 1976.** Grape Growing. A Wiley Interscience Publication.

**Weinberger, J.H., and Harmon, F.N. 1966.** Harmony, a new nematode and phylloxera resistant rootstock for vinifera grape. Fruit Varieties and Horticultural Digest 20:63–65.

**Williamson, V.M., and Hussey, R.S. 1996.** Nematode pathogenesis and resistance in plants. Plant Cell 8: 1735-1745.

**Williamson, VM. 1991.** Molecular Techniques for Nematode Species Identification. In Nickle, WR. ed. Manual of Agricultural Nematology. New York. USA. Marcel Dekker Inc. p. 107-123.

**Wyss, U., Grundler, F.M.W., and Munich, A. 1992.** The parasitic behaviour of second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. Nematológica 38: 98-111.

**Zasada, I. A., Riga, E., Pinkerton, J. N., Wilson, J. H., and Schreiner, R. P. 2012.** Plant-parasitic nematodes associated with grapevines, *Vitis vinifera*, in Washington and Idaho. American Journal of Enology and Viticulture 63:522–528.